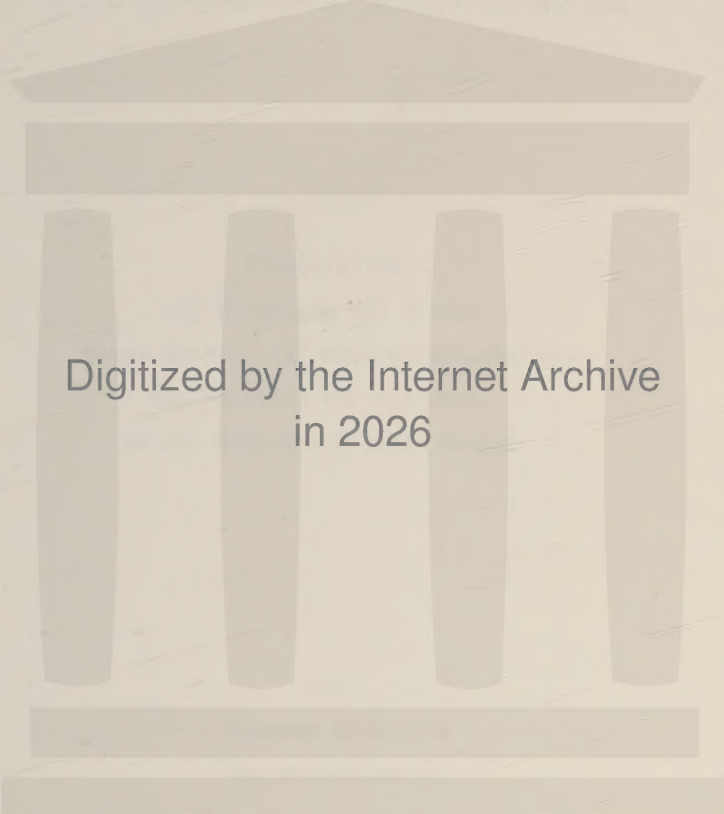


**Genetik der
extrazellulären Lipase
von
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Susanne Wohlfarth
aus Braunschweig

Bochum 1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543113_0031

GENETIK DER
EXTRAZELLULÄREN LIPASE
VON
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Susanne Wohlfarth
aus Braunschweig

Bochum 1988

Referent: Prof. Dr. U. Winkler

Korreferent: Prof. Dr. U. Kück

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.1988

Die vorliegende Dissertation wurde am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Winkler angefertigt.

Herrn Prof. Dr. U. Winkler gilt mein besonderer Dank für die Anregung zum Thema dieser Promotionsarbeit, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, sowie seine hilfreiche Unterstützung durch fachliche Betreuung und großes Interesse in vielen anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. U. Kück möchte ich für die Übernahme des Korreferats zu dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. W. Rüger und Herrn Prof. Dr. W. Hengstenberg sowie ihren Arbeitsgruppen für die Einweisung in das "Sequenzierungsgeschäft" und das allgemeine Interesse an meiner Arbeit.

Bei Frau P. Wahl möchte ich mich für ihre qualifizierte Mitarbeit bei der Durchführung vieler Experimente bedanken.

Außerdem möchte ich hier alle diejenigen berücksichtigen, die durch Überlassung von Bakterienstämmen, Phagen und Plasmiden zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der Firma Gist-brocades, Delft (Holland), insbesondere den Herren Dr. J. A. van den Berg und Dr. P. Andreoli, bin ich zu Dank verpflichtet, da sie durch großzügige finanzielle Hilfe die Sequenz-Untersuchungen unterstützt haben.

Ferner möcht ich allen Mitarbeiterinnen von Labor 790 für das Zustandekommen eines harmonischen Arbeitsklimas danken.

Abkürzungen

1.	EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
	Materialien	11
2.1.	Bakterien, Phagen und Plasmide	11
2.2.	Nährmedien	15
2.3.	Puffer und Lösungen	21
2.4.	Enzyme und Chemikalien	23
2.5.	Geräte	25
	Mikrobiologische und biochemische Methoden	25
2.6.	Anzuchten	25
2.6.1.	Bakterienanzuchten	25
2.6.2.	Phagenanzuchten und Lysatgewinnung	26
2.7.	Isolierung von Mutanten	26
2.8.	Nachweis von Exoprodukten in Plattentestverfahren	27
2.9.	Beeinflussung der extrazellulären Lipase(aktivität)	28
2.9.1.	Zugabe von exogenem Alginat oder Olivenöl	28
2.9.2.	Einfluß von Triton X-100	28
2.10.	Phagenlysisstest	29
2.11.	Gewinnung äußerer Membranen (OM) und Darstellung ihrer Komponenten	29
2.11.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von LPS	30
2.11.2.	Darstellung von OM-Proteinen	31
2.12.	Enzym-Tests	32
2.12.1.	Lipase-Test, photometrisch (=pNPP-Test)	32
2.12.2.	Lipase-Test, bioluminometrisch	32
2.12.3.	Esterase-Test, photometrisch	34
2.12.4.	Succinat Dehydrogenase-Test, photometrisch	34
2.13.	Zelldichte- und Zellzahlbestimmung	34

Kreuzungsgenetische Methoden	34
2.14. Konjugationen	34
2.14.1. Plasmid FP5	35
2.14.2. Plasmid R68.45	35
2.15. Transduktion	35
Molekulargenetische Methoden	36
Klonierung	
2.16. Methoden zur DNA-Isolierung	36
2.16.1. Gewinnung chromosomaler DNA	36
2.16.2. Plasmidpräparationen	36
2.17. Präzipitation von Nukleinsäuren	37
2.18. Reinigung von Nukleinsäuren	38
2.18.1. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	38
2.18.2. Extraktionen mit organischen Verbindungen	38
2.19. <i>in vitro</i> Rekombination von DNA	39
2.19.1. DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen	39
2.19.2. Dephosphorylierung	39
2.19.3. Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.20. Transformation von Bakterienzellen	40
2.20.1. Transformation von <i>P. aeruginosa</i>	40
2.20.2. Transformation von <i>E. coli</i>	40
2.21. Agarosegele	41
2.21.1. Agarosegelelektrophorese	41
2.21.2. Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
Sequenzierung	
2.22. Gewinnung von M13-DNA	42
2.22.1. Isolierung der replikativen Form (RF) der M13-DNA	42
2.22.2. Isolierung von M13 (ss)-Einzelstrang-DNA; template-DNA	42
2.23. Isolierung von M13 "shot-gun" Klonen	43
2.24. Gewinnung von M13 Klonen für gezielte Sequenzierungen	44
2.25. DNA-Sequenzierung	44
2.25.1. Sequenzierung mit Klenow-Enzym	45
2.25.2. Sequenzierung mit Klenow-Enzym, erweiterte Form	46
2.25.3. Sequenasereaktion	47
2.26. DNA-Sequenzgele	47
2.27. Auswertung der Nukleotidsequenz	48

3.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	49
3.1.	Calcium-Triolein Selektivmedium	49
3.2.	Isolierung von Lip ⁻ -Mutanten	50
3.3.	Mikrobiologische und biochemische Charakterisierung der Lip ⁻ -Mutanten	52
3.3.1.	Bestimmung der extrazellulären Lipaseaktivität	53
3.3.2.	Einfluß von Triolein, exogenem Alginat und Triton X-100 auf die extrazelluläre Lipaseaktivität	56
3.3.3.	Allgemeine Bildung von Exoprodukten	60
3.3.4.	Betrachtungen der äußeren Membran	62
3.4.	Lokalisierung des lip-Genlocus auf der Genkarte von <i>P. aeruginosa</i> PAO1	65
3.4.1.	Grobkartierung mit Plasmid FP5	66
3.4.2.	Feinkartierung mit Plasmid R68.45	68
3.4.3.	Transduktion mit dem Phagen G101	71
3.5.	Klonierung des Lipase-Gens von <i>P. aeruginosa</i> PAO1	76
3.5.1.	Klonierungsversuche im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	76
3.5.2.	Klonierung im homologen Wirt <i>P. aeruginosa</i> PAO	77
3.6.	Charakterisierung des Plasmids pSW1	80
3.6.1.	Subklonierung des Plasmids pSW1	82
3.6.2.	Restriktionsanalyse des Plasmids pSW101	84
3.7.	Expression des klonierten Lipase-Gens von <i>P. aeruginosa</i> PAO1	85
3.7.1.	Expression im homologen Wirtssystem	85
3.7.2.	Expression im heterologen Wirtssystem	87
3.8.	Sequenzierung des Lipase-Gens von <i>P. aeruginosa</i> PAO1	90
3.8.1.	Vorbereitung der zu sequenzierenden Klone	90
3.8.2.	Sequenzanalyse des 2,3 kb Sal I-Doppelfragments	90
3.8.3.	Sequenz des Lipase-Gens	93
3.8.4.	Auswertung des offenen Leserahmens für die Lipase	93
3.8.5.	Auswertung der abgeleiteten Aminosäuresequenz für das Lipase-Protein	102
4.	DISKUSSION	105
5.	ZUSAMMENFASSUNG	122
6.	LITERATUR	124
	ANHANG 1 und 2	142

ABKÜRZUNGEN

Ap ^R / S	Ampicillin: Resistenz/Sensitivität
AS	Aminosäure
ASW	künstliches Seewasser (artificial sea water)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
ccc-DNA	covalently closed circular (Superhelix) DNA
Cm ^R / S	Chloramphenicol: Resistenz/Sensitivität
CT-Agar	Calcium-Triolein-Agar
D	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EU	Enzymeinheiten (enzyme units)
g	Erdbeschleunigung
Hg ^R	Quecksilberresistenz
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Km ^R / S	Kanamycin: Resistenz/Sensitivität
LB	Luria Bouillon (broth)
LPS	Lipopolysaccharid
moi	Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NB	Nährbouillon (nutrient broth)
NG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (Nitrosoguanidin)
O.D.	optische Dichte
OM	äußere Membran (outer membrane)
orf	offener Leserahmen (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PFU	Plaque-bildende Einheit (plaque forming unit)
pNPP	para-Nitrophenylpalmitat
RF	replikative Form
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
RT	Raumtemperatur
SD	Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz)
³² S-dATP	Desoxyadenosin 5'-(³² S)thiotriphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm ^R / S	Streptomycin: Resistenz/Sensitivität
ss	einzelsträngig (single strand)
Tc ^R / S	Tetracyclin: Resistenz/Sensitivität
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ts	temperatursensitiv
TX	Triton X-100
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-Indolyl-β-D-Galaktosid

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Einführung

Auf Grund ihrer vielfältigen und häufig einmaligen Stoffwechselleistungen werden die *Pseudomonaden* seit einigen Jahren immer intensiver untersucht. Dabei lassen sich zwei Hauptinteressengebiete erkennen:

1. *Pseudomonaden* als Nutzorganismen

-Abbau von Umweltchemikalien und ökologische Bedeutung

2. *Pseudomonaden* als Krankheitserreger

-hohe natürliche Antibiotika-Resistenzen

-extrazelluläre Produkte als Pathogenitätsfaktoren

Neben der rein biochemischen Bearbeitung der Probleme hat sich gleichermaßen die genetische Analyse etabliert. Bekannte Methoden, die mit dem Modellorganismus *Escherichia coli* entwickelt wurden, müssen dazu an die spezifischen Bedingungen der *Pseudomonaden* adaptiert werden. Verfahren, die nach allgemeingültigen chemischen Gesetzmäßigkeiten arbeiten, wie die chemische Mutagenese, die Klonierung oder Sequenzierung eines Gens, lassen sich verhältnismäßig leichter angleichen als biologisch definierte Methoden zur Genkartierung mit Plasmiden und Phagen bzw. Expressionsversuche im homologen und heterologen Wirtsorganismus.

Dies spiegelt sich beispielsweise auch in der Entwicklung der *Pseudomonas aeruginosa*-Genetik wider:

Nach anfänglichen Konjugationsversuchen mit *P. aeruginosa* PAO1 im Jahr 1955 (HOLLOWAY, 1955) konnten ROYLE und Mitarbeiter erst 26 Jahre später (1981) eine zirkuläre Genkarte mit ungefähr 100 Genmarken aufstellen. Anschließend (1981-1987) wurde die Genkarte noch dreimal rekaliibriert. Sehr viel schneller wurden hingegen Ergebnisse mit molekulargenetischen Untersuchungsmethoden erzielt. Von der Bereitstellung eines ersten funktionstüchtigen Vektorsystems (BAGDASARIAN et al., 1981) bis zur Sequenzanalyse einzelner Gene (MINTON et al., 1984) vergingen nur drei Jahre. Seit 1986 finden sich in der Literatur zur *Pseudomonas*-Genetik fast ausschließlich Klonierungs- und Sequenzierungsergebnisse, die zur Aufklärung von Struktur/Funktionsbeziehungen ausgewertet werden.



Die genetischen Teilgebiete: Mutagenisierung, Kartierung, Klonierung, Genexpression und Sequenzierung sollen im Folgenden speziell angesprochen werden.

Mutagenisierung

Das Verfahren der chemischen Mutagenese mit alkylierenden Agenzien wie N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (Nitrosoguanidin oder NG) und Ethylmethansulfonat (EMS) findet bei den *Pseudomonaden* uneingeschränkte Anwendung (HOLLOWAY, 1986), da die Reaktionsmechanismen auf DNA-Ebene allgemeingültigen Regeln unterliegen. NG beispielsweise löst an der Replikationsgabel meist mehrere eng benachbarte Transitionen (GC→AT) aus, was entsprechend häufig zu Mehrfachmutationen führt (GUEROLA et al., 1971). Potente Selektions- und Charakterisierungsmethoden ermöglichen dann das Auffinden der gewünschten Mutanten.

Zu den biologischen Mutageneseverfahren zählt die Genveränderung mit Hilfe transponierbarer Elemente, die einem Organismus zusätzlich selektierbare Antibiotika-Resistenzen vermitteln (KLECKNER et al., 1977). Die dafür anfangs von den Enterobakterien übernommenen Transposone Tn1, Tn5, Tn7 und Tn10 waren in *Pseudomonaden* aus verschiedenen Gründen nur bedingt anwendbar: Tn1 und Tn7 integrieren nur selten und dann an bevorzugten Stellen in das *P. aeruginosa*-Chromosom (CARUSO & SHAPIRO, 1982; KRISHNAPILLAI et al., 1981), die Tetracyclin-Resistenz von Tn10 wird in *Pseudomonaden* kaum exprimiert (HOLLOWAY, 1986), und die Übertragung von Tn5 kann wegen der hohen natürlichen Kanamycin-Resistenz der *Pseudomonaden* nicht erkannt werden (HOLLOWAY, 1986). Weiterentwicklungen erlauben jetzt den Einsatz von speziellen Konstrukten wie Tn5-751 (Km^R, Tri^R) (HAAS et al., 1984) oder von *Pseudomonas*-spezifischen Transposonen wie Tn501 (Hg^R) (TSUDA et al., 1984). Letztere integrieren allerdings häufig als unlösliche Cointegrate mit dem gesamten sie tragenden Plasmid in das *Pseudomonas*-Chromosom (Poole & Hancock, 1986).

Kartierung

Die Möglichkeit zur Erstellung einer Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1 war lange Zeit eingeschränkt, da keine effizienten Chromosomentransfer-Systeme bekannt waren. Die anfänglichen Übertragungsversuche mit Plasmid FP2 und FP5 ergaben eine Mobilisierung des Chromosoms von *P. aeruginosa* PAO1 gegen den Uhrzeigersinn vom späterhin als 0 min definierten Startpunkt. Dabei werden Genloci bis 30 min mit einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-4} pro Donorzelle, entferntere Genmarken seltener oder gar nicht übertragen (MATSUMOTO & TAZAKI, 1973; HAAS et al., 1977). Eine Weiterentwicklung erfuhr das Arbeitsgebiet durch die Selektion des Transferplasmids R68.45 (HAAS & HOLLOWAY, 1976). Es hat die Eigenschaft, von verschiedenen Startpunkten aus (ca. 50 auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1), in alternativer Richtung, ungefähr 10 min des Chromosoms zu mobilisieren, so daß jeder Genlocus mit einer Transferfrequenz von 10^{-3} pro Donorzelle übertragen wird (HAAS & HOLLOWAY, 1976). Als Mechanismus liegt hier wahrscheinlich die Cointegratbildung zwischen IS21-Elementen des Plasmids und des Chromosoms zugrunde (WILLETTS et al., 1981). Durch die Verwendung des Plasmids R68.45 konnte die Zirkularität des Chromosoms von *P. aeruginosa* PAO1 gezeigt und erstmals auch seine relative Länge auf 105 min bestimmt werden (ROYLE et al., 1981). Eine Revision der relativen Genkartenlänge durch Verkürzung auf 95 min wurde durch Untersuchungen von HOLLOWAY & CROCKETT (1982) nötig.

Ebenfalls auf der Basis integrierter Transposone (Tn2521) beruht das neuste von O'HOY & KRISHNAPILLAI (1985) entwickelte Mobilisierungssystem, das in Effizienz und Einheitlichkeit dem Hfr-System von *E. coli* vergleichbar ist. Das Plasmid pMO514 wurde verwendet, um die *P. aeruginosa* PAO1-Genkarte auf nunmehr 75 min relative Länge zu rekaliбrieren (O'HOY & KRISHNAPILLAI, 1987). Diese Neubewertung hat Einfluß auf die Lageangabe der Genloci in "min", nicht aber auf die relative Anordnung der ca. 200 bekannten Genloci zueinander. Außerdem wurde die für *P. aeruginosa* PAO1 typische "viereckige" Darstellung der Genkarte gleichzeitig in eine zirkuläre Grafik umgestellt (vergl. Abb.5).

Weitere Genkarten wurden für *P. aeruginosa* PAT (WATSON & HOLLOWAY, 1978) und für *P. putida* PPN (MORGAN & DEAN, 1985) aufgestellt.

Klonierung und Expression

Grundlage für molekulargenetische Arbeiten sind spezielle Vektorsysteme, die bei *Pseudomonaden* meist auf Plasmiden mit weitem Wirtsspektrum aufbauen. Sie tragen bevorzugt das Replikon des IncP-4 Plasmids RSF1010 wie beispielsweise die pKT- und pMMB-Vektoren (BAGDASARIAN et al., 1981) oder das Replikon von RK2 (IncP-1), welches u. a. in dem häufig verwendeten Cosmid pLAFR1 vorliegt (FRIEDMAN et al., 1982). Nachteile dieser Plasmide sind ihre Größe (>10 kb), die relativ geringe Zahl von Klonierungsstellen und oft nicht selektierbare Antibiotika-Resistenzen. Kleinere Vektoren wie pRO1614 (6,1 kb) (OLSEN et al., 1982), die *Pseudomonas*-spezifisch arbeiten, sind nicht allgemein frei verfügbar (Patent).

Auf der Basis von Plasmiden mit weitem Wirtsspektrum sind auch neuere Expressionsvektoren mit multiplen Klonierungssequenzen entstanden. Die mit IPTG induzierbaren *lac*- oder *tac*-Promotoren der Vektoren pMMB66 EH/HE (8,9 kb) (FÜRSTE et al., 1986) und pWS4/6 (10,8 kb; 12 kb) (WERNEKE et al., 1985) ermöglichen deshalb Genexpressionsversuche sowohl in *Pseudomonaden* als auch in *E. coli*. Ein zweites interessantes Expressionssystem mit dem Vektor pNM185 (14 kb) (MERMOD et al., 1986) funktioniert über Coinduktion des *P_a*-Promotors (TOL-Plasmid) durch das *xylS* Genprodukt und Benzoesäure.

Bei Expressionsversuchen von *Pseudomonas*-Genen im heterologen Wirtsorganismus *E. coli* muß zweierlei berücksichtigt werden:

1. viele der *Pseudomonas*-Gene scheinen positiv reguliert zu sein (DERETIC et al., 1987), sie funktionieren nur bei gleichzeitiger Klonierung des Regulationsgenes.
2. die meisten *Pseudomonas*-Promotoren werden von der *E. coli* DNA abhängigen RNA-Polymerase nicht erkannt, eine Expression kann dann nur von einem *E. coli*-Promotor ausgehend ablaufen (vergl. auch "Sequenzierung"). Im Umkehrschluß werden aber *E. coli*-Promotoren in *Pseudomonaden* generell gut erkannt.

Sequenzierung

An die Sequenzierungsmethoden werden spezielle Anforderungen gestellt, da insbesondere die DNA von *P. aeruginosa* mit einem G/C

Basenanteil von 67 % (BERGAN, 1981) zur Ausbildung von Sekundärstrukturen tendiert. Die Analyse von knapp 30 *Pseudomonas*-Genen, davon ca. 10 von *P. aeruginosa*, hat ergeben, daß es für diese Gene eine Ribosomenbindestelle gibt, die der *E. coli*-Konsensussequenz AGGA bzw. GAGG entspricht. Allerdings konnte keine Promotorkonsensussequenz für *Pseudomonas*-Gene gefunden werden, da ihnen jeweils einer von drei verschiedenen Typen vorgeschaltet sein kann:

Typ 1: Es besteht keine Übereinstimmung mit bereits bekannten Promotorsequenzen wie bei den *P. aeruginosa*-Genen *algD* (DERETIC et al., 1987) und *toxA* (GRAY et al., 1984; GRANT & VASIL, 1986).

Typ 2: Die -35 und -10 Region entspricht exakt einem *E. coli*-Promotor (TTGACA / TATAAT), was für das äußere Membranprotein Porin F gefunden wurde (DUCHENE et al., 1988).

Typ 3: Bei -26/-16 tritt eine Konsensussequenz auf, die durch eine σ^{60} abhängige RNA-Polymerase erkannt wird (CTGGxAXy / TTGCA). Dies ist beispielsweise für das Pilin-Gen (PASLOSKE et al., 1985; JOHNSON et al., 1986) und Gene des Abbaus chlorierter Aromaten bekannt (INOUE et al., 1984).

Zwischen Typ2- und Typ3-Promotoren scheint es strukturelle Übergangsformen zu geben (DERETIC et al., 1987a).

Darüberhinaus wurde für einige Gene (*toxA*; *algD*; *plc*; *lip*), die u. a. für extrazelluläre Produkte kodieren, eine potentiell regulatorische 12 Basen lange Sequenz gefunden, die durch fünf aufeinanderfolgende Adeninreste charakterisiert wird: AAAAACCAACCG (GRANT & VASIL, 1986; DERETIC et al., 1987b; PRITCHARD & VASIL, 1986; KUGIMIYA et al., 1986).

Genetik der Exoprodukte

Die Entwicklung in den hier aufgeführten Teilgebieten der *Pseudomonas*-Genetik hat dazu beigetragen, biochemisch bereits recht gut charakterisierte extrazelluläre Produkte von *P. aeruginosa*, die den Pathogenitätsfaktoren dieses Organismus zugerechnet werden, auch auf DNA-Ebene zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt einerseits auf den Exoenzymen Exotoxin A, Exoenzym S, Elastase, alkali-

sche Protease, Phospholipase C und Lipase und andererseits auf der Synthese des Exopolysaccharids Alginat (gebildet von mucoiden Derivaten von *P. aeruginosa*).

Da einige der betrachteten Exoenzyme während der spät-exponentiellen Wachstumsphase oder in Abhängigkeit verschiedener Medienkomponenten im extrazellulären Milieu auftreten (NICAS & IGLEWSKI, 1986), bedarf es neben einer regulierten Synthese auch eines kontrollierten Exportes über die innere und äußere Membran der Gram-negativen *P. aeruginosa*-Bakterien. Untersuchungen von Exoprodukten müssen demzufolge auf drei Ebenen vorangetrieben werden: Exoprodukt, Regulation, Transport.

Die Genloci der Strukturgene einiger Exoprodukte (*toxA*; *pvd*; *lip*; *las(A), B*) und Enzyme der Alginatbiosynthese (*alg*) wurden mit Hilfe von Mutanten kartiert, sie verteilen sich ohne erkennbares Muster über das gesamte Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1 (vergl. Abb. 5 - einschließlich Zitate). Gleiches gilt für Genmarken, die mit Regulations- und Exportphänomenen (*xcp*; *xch*) verknüpft sind. Veränderungen in diesen Genen führen allgemein zu pleiotropen Mutanten, die bezüglich des Auftretens verschiedener Exoprodukte defekt sind (WRETLIND & PAVLOVSKIS, 1984; BJÖRKLIND et al., 1985). Diejenigen Exoprodukte, welche gleichen Regulations- und/oder Transportmustern unterliegen, fallen dabei gemeinsam aus.

Molekulargenetische Untersuchungen haben zur Aufklärung der Strukturgene von Exotoxin A - *toxA* (GRANT & VASIL, 1986), Phospholipase C - *plc* (PRITCHARD & VASIL, 1986), Elastase - *lasB* (SCHAD et al., 1987) und GDP-Mannose Dehydrogenase - *algD* (DERETIC et al., 1987b) geführt. Diese Ergebnisse sind Grundlage für Transkriptions-, Translations-, Regulations- und Expressionsversuche.

Diese Ergebnisse haben auch Aufschluß über den Transport von Exotoxin A und Phospholipase C über die innere Membran gegeben (GRAY et al., 1984; PRITCHARD & VASIL, 1986). Er verläuft gemäß den Vorgaben der "Signal"-Hypothese (EMR et al., 1980): eine aminoterminal Sequenz des Proteins, die aus 25 bzw. 38 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren besteht, wird während des Durchtritts in der inneren Membran verankert und nach Abschluß des Prozesses proteolytisch abgespalten.

Keinerlei molekulargenetische Daten (klonierte Gene oder Gensequenzen) existieren über Translokationsvorgänge an der äußeren Membran, da dieser Freisetzungsschritt der Exoprodukte auch noch

wenig verstanden ist. Für das Exotoxin A wird die Freisetzung über sogenannte "Bayer junctions" - Adhäsionszonen zwischen innerer und äußerer Membran - diskutiert (LORY et al., 1983), Exoprotease soll aus einer im Periplasma lokalisierten Vorstufe durch Entfernen nicht-kovalenter Inhibitor-moleküle diesen Exportschritt vollziehen (FECYCH & CAMPBELL, 1985). Dabei spielt möglicherweise das Genprodukt von *lasA* eine Rolle (GOLDBERG & OHMAN, 1987; SCHAD & IGLEWSKI, 1988).

Außer der physiologischen Regulation der Exoprodukte, die in Abhängigkeit der Eisen- (Exotoxin A, Elastase, alkalische Protease, Pyocyanin, Fluorescein) oder Phosphatkonzentration (Phospholipase C, alkalische Phosphatase) (NICAS & IGLEWSKI, 1986) funktioniert, konnten für das Exotoxin A und die GDP-Mannose Dehydrogenase die spezifischen, positiven Regulatorgene *toxR* (WOZNIAK et al., 1987) und *algR* (DERETIC et al., 1987a) gefunden werden.

Lipasen

Ein hinsichtlich seiner Genetik noch gar nicht untersuchtes Exoenzym von *P. aeruginosa* ist die Lipase. Dieses nach seiner Funktion als Glycerol-Ester Hydrolase (EC 3.1.1.3) eingeordnete Enzym spaltet an der Wasser/Lipidphasengrenze langkettige Acylglycerole wie beispielsweise Triolein.

STÜER et al. (1986) konnten die Exolipase von *P. aeruginosa* PAC1R im analytischen Maßstab bis zur Homogenität reinigen und erhielten außerdem folgende Informationen über das Enzym: Molekulargewicht: 29000; isoelektrischer Punkt: pK=5,8; LPS-assoziiert; amphiphiles Molekül (ADRIAN, 1987); keine ausgeprägte Substrat-, keine Positionsspezifität (HANNUSCHKA, 1987).

Darüberhinaus ist über Regulation und Ausschleusung der Lipase noch nichts bekannt, lediglich ein Einfluß von exogenem Polysaccharid wird in der "detachment"-Hypothese erörtert (SCHULTE et al., 1982). Als Pathogenitätsfaktor wirkt die Lipase möglicherweise nur in Verbindung mit Phospholipase C (JÄGER, pers. Mitteilung), eine biologische Rolle für das Bakterium ist unbekannt.

Bakterielle Exolipasen werden sowohl von Gram-negativen Organismen, insbesondere *Pseudomonaden* (BORGSTRÖM & BROCKMAN, 1984), als auch Gram-positiven Stämmen gebildet, wobei die *Staphylococcus*

aureus- (ROLLOF et al., 1987a,b) und *S. hyicus*-Lipase (GÖTZ et al., 1985) am besten untersucht sind.

DNA-Sequenzdaten liegen bereits für eine *P. fragi*-Lipase des Molekulargewichts 15000 (KUGIMIYA et al., 1986) und für das entsprechende Enzym (71000) aus *S. hyicus* (GÖTZ et al., 1985) vor. Vergleiche haben ergeben, daß beide Proteine über ein Signalpeptid für den Transport über die Cytoplasmamembran verfügen müssen, und daß die auch in eukaryontischen Lipasen auffindbare, hochkonservierte Aminosäuresequenz Gly-His-Ser-X-Gly, mit dem Serinrest als Kernstück, vermutlicherweise das aktive Zentrum repräsentiert (KUGIMIYA et al., 1986).

Aus eukaryontischen Systemen werden die extrazellulären Pilz-Lipasen wegen ihrer speziellen Reaktionscharakteristika bevorzugt in der organischen Chemie und Lebensmittelchemie für spezifische Umesterungsreaktionen eingesetzt (LAZAR, 1985). Die von Mikroorganismen gebildeten Lipasen finden außerdem immer mehr Interesse in der Waschmittelindustrie.

Darüberhinaus gibt es natürlich im Gastrointestinaltrakt höherer Eukaryonten eine Vielzahl, insbesondere aus medizinischen Gründen, gut untersuchter Lipasen, die teilweise ebenfalls kloniert und sequenziert wurden, z. B. menschliche Lipoprotein-Lipase (WION et al., 1987) und menschliche Magenlipase (BODMER et al., 1987). Auch ihre DNA-Sequenzen ergeben dieselbe Aneinanderreihung von Aminosäuren im aktiven Zentrum wie bereits für die bakteriellen Lipasen gefunden.

Problemstellung

Wie in der Einführung verdeutlicht, hat das Interesse an den extrazellulären Produkten von *P. aeruginosa* in den letzten Jahren sehr stark zugenommen. Dabei ergeben sich aus einer Kombination von biochemischen und genetischen Untersuchungen einerseits Hinweise auf die Beteiligung einzelner Exoprodukte an der Pathogenität des Organismus und andererseits können allgemeine Aussagen über Regulations- und Exportmechanismen gemacht werden.

Für die extrazelluläre Lipase von *P. aeruginosa* wurden bereits einige biochemische Charakteristika analysiert, eine genetische Be-

trachtung fehlte allerdings noch völlig. Die vorliegende Arbeit sollte diese Lücke schließen.

Die Bearbeitung des Themas läßt sich in drei Abschnitte untergliedern:

1. Vorarbeiten
2. klassische Genetik
3. molekulare Genetik

Während Teil 1 Voraussetzung für alle folgenden Untersuchungen ist, ergeben sich für Teil 2 und 3 fließende Übergänge. Die Einzelpunkte umfassen folgende Fragestellungen:

1. Vorarbeiten
 - Auswahl eines genetisch bereits recht gut charakterisierten Stammes von *P. aeruginosa*, der auch eine extrazelluläre Lipase bildet
 - Etablierung eines Selektionsmediums zur spezifischen Unterscheidung zwischen *lip⁺*- und *lip*-Kolonien
2. klassische Genetik
 - Gewinnung von Mutanten, die phänotypisch *lip⁻* sind
 - Charakterisierung der Mutanten mit dem Ziel, die gewünschten Strukturgenmutanten von solchen mit Transport- und/oder Regulationsdefekten abzugrenzen. Zur Erleichterung einer eindeutigen Charakterisierung sollten möglichst temperatursensitive (*ts*) Mutanten selektiert werden; mit Hinblick auf anschließende Klonierungsarbeiten wären Transposon-induzierte Mutanten vorteilhaft
 - Konjugations- und Transduktionsversuche zur Kartierung des Lipase-Genlocus auf der Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1
3. molekulare Genetik
 - Klonierung des Lipase-Gens entweder im heterologen Wirtssystem *E. coli* (Selektion durch Lipaseaktivitätsbestimmung) oder im homologen *P. aeruginosa*-System (Selektion durch Komplementation des *lip*-Strukturgendefekts)
 - Charakterisierung des erhaltenen Klons

- Expressionsversuche in beiden Wirtssystemen mit der Zielsetzung einer Überproduktion des Enzyms
- DNA-Sequenzanalysen als Grundlage für die strukturelle Aufklärung der Lipase.

2. MATERIAL UND METHODEN

Materialien

2.1. Bakterien, Phagen und Plasmide

Bakterien

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Genotyp	Referenz
PAO 1	Wildtyp, prototroph	HOLLOWAY et al. (1979)
PAO 8	<i>met-28 ilv-202 str-1</i>	ISAAC & HOLLOWAY (1968)
PAO 25	<i>argF10 leu-10</i>	HAAS & HOLLOWAY (1976)
PAO 166	<i>leu-10 pyrF</i>	ROYLE et al. (1981)
PAO 325	<i>argB18 lys-57</i>	ISAAC & HOLLOWAY (1972)
PAO 388	<i>aro-1 pyrF69 pur-70</i>	ROYLE et al. (1981)
PAO 436	<i>ser-3 bla-436</i>	KRISHNAPILLAI et al. (1981)
PAO 2302	<i>catA1 met-9020 puuA1</i>	MATSUMOTO et al. (1978)
PAO 4020	<i>nir-9006 his-9004 str-9002</i>	MATSUMOTO et al. (1981)
PAO 4044	<i>met-9020 catA1 nar-9011 mtu-9002 tyu-9030 dcu-9041</i>	
29-1	wie PAO 2302 <i>lip1</i>	
29-4	wie PAO 2302 <i>lip1 arg</i>	WOHLFARTH & WINKLER (1988)
6-1	wie PAO 2302 <i>lip2</i>	
6-4	wie PAO 2302 <i>lip2 arg</i>	NG-Mutanten von PAO2302
29-2	wie PAO 2302 <i>lip1 leu</i>	
6-2	wie PAO 2302 <i>lip2 leu</i>	
28-1	wie PAO 2302 <i>lip3</i>	diese Arbeit
17-1	wie PAO 2303 <i>lip4</i>	

<i>Escherichia coli</i>	Genotyp	Referenz
SK 1108	F ⁻ <i>pyrF</i> Km ^R <i>gal</i> <i>thi</i> <i>sup</i> Ti-R <i>hsdR4</i> <i>endA</i> <i>sbcB15</i>	DONOVAN & KUSHNER (1983)
JM 109	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) (F' <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q <i>ZΔM15</i>)	YANISCH-PERRON et al. (1985)
K 38	HfrC λ	RUSSEL & MODEL (1984)
MT 120	<i>recA</i> -Derivat von MC 1000 (F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>araABO1C-leu</i>) 7679 <i>galUK</i> Δ <i>lacX74</i> <i>rpsL</i> <i>thi</i>)	CASADABAN & COHEN (1980)
<i>Vibrio harveyi</i>		
M17-LP	<i>dim lip</i>	ULITZUR (1979)

Die Genbezeichnungen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *P. aeruginosa* (HOLLOWAY & MATSUMOTO, 1984) und *E. coli* (BACHMANN, 1983); *lip* bedeutet: Fehlen extrazellulärer Lipaseaktivität.

Phagen

<i>P. aeruginosa</i> Phagen	Phänotyp	Referenz
virulent		
F8	Rezeptoren:	
44		
E 79	glattes LPS	
109		
2	LPS oder	NICAS & HANCOCK (1980)
B5A	Protein	
7		
21	Protein	
68		
temperent		
generell transduzierend		
G101	Protein; HCM	HOLLOWAY & VAN DE PUTTE (1968)
F116L	Protein; HCM	KRISHNAPILLAI (1971)
HCM = empfindlich für wirtskodierte Modifikation		
<i>E. coli</i> Phagen	Genotyp	Referenz
M13mp18	P_{lac} <i>lacZ</i>	NORRANDER et al. (1983)
M13mp19		

Plasmide

<i>P. aeruginosa</i> Phänotyp		Referenz
Plasmide		
FP5	Hg ^R Cma	MATSUMOTO & TAZAKI (1973)
R68.45	Cb ^R Nm ^R Km ^R Tc ^R Cma	HAAS & HOLLOWAY (1976)
<i>E. coli</i>		
Plasmide		
pcos2EMBL	2·cos Tc ^R Km ^R	POUSTKA et al. (1984)
pUN121	Pl <i>cI</i> Ap ^R (Tc ^R)	NILSSON et al. (1983)
pUC18	Plac <i>lacZ</i> Ap ^R	YANISCH-PERRON et al. (1985)
pUC19		
pGP1-2	Plac Pl <i>cI857 T7pol</i> Km ^R	TABOR & RICHARDSON (1985)
pT7-6	P _{Ø10} Ap ^R	
pSW103A/B	pUC19	} je mit dem 2,3 kb Sali } diese Arbeit
pSW104A/B	pT7-6	
pSW105A/B	M13mp18	
	fragm. aus pSW 101	
Plasmide mit weitem Wirts- spektrum		
pKT248	Sm ^R Cm ^R	BAGDASARIAN et al. (1981)
pSW1	Sm ^R 3,1 kb Sali Fragm. (<i>P.aeruginosa</i> PAO1-DNA)	WOHLFARTH & WINKLER (1988)
pSW101	Sm ^R 2,3 kb Sali Sub- fragm. aus pSW1	} diese Arbeit

Resistenzen: Ap (Ampicillin); Cb (Carbenicillin); Hg (Quecksilber); Km (Kanamycin); Nm (Neomycin); Tc (Tetracyclin)
Cma: Chromosomen mobilisierende Aktivität

2.2. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren bei 200 kPa (20 min) sterilisiert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika und Aminosäuren wurden sterilfiltriert (Sartorius-Membranfilter, Porendurchmesser 0,45 µm).

Komplettmedien

NB-Medium für *P. aeruginosa*

8 g Nährbouillonpulver (Difco, Oxoid)

4 g NaCl

ad 1000 ml H₂O dest.

LB-Medium für *E. coli*

MANIATIS et al. (1982)

10 g Trypton (Difco, Oxoid)

5 g Hefeextrakt (Difco, Oxoid)

10 g NaCl

0,3 ml 4 M NaOH

ad 1000 ml H₂O dest. pH 7,5

NB- und LB-Selektivmedien

Den Selektivmedien wurden die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml), Kanamycin (500 µg/ml), Streptomycin (50 µg/ml) oder Tetracyclin (12 µg/ml) zugesetzt. Die Endkonzentration von HgCl₂ betrug 4 µg/ml.

ASW-Medium für *V. harveyi*

ULITZUR (1979)

5 g Casaminoacids (Difco)
 3 ml 86 %iges Glycerin
 40 ml 500 mM MOPS-Puffer pH 7,3
 ad 1000 ml ASW

ASW (künstl. Seewasser):
 300 mM NaCl
 10 mM KCl
 50 mM MgSO_4
 10 mM CaCl_2
 0,3 mM K_2HPO_4

Minimalmedien

Die Einzellösungen der Minimalmedien wurden getrennt autoklaviert.

M9-Medium

MANIATIS et al. (1982)

750 ml H_2O dest.
 100 ml Salzlösung
 100 ml 4 % (w/v) Glukose
 10 ml 100 mM MgSO_4
 10 ml 10 mM CaCl_2

Salzlösung:
 400 mM Na_2HPO_4
 200 mM KH_2PO_4
 190 mM NH_4Cl
 30 mM NaCl

Zum Supplementieren wurden die Aminosäuren Arginin, Histidin, Iso-leucin, Leucin, Lysin, Methionin und Serin in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt.

MOST-Medium

ORNSTON & STANIER (1966)

758 ml H ₂ O dest.	
200 ml Salzlösung	Salzlösung:
10 ml 760 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	255 mM Na ₂ HPO ₄
10 ml 235 mM MgSO ₄	225 mM KH ₂ PO ₄
10 ml 45 mM CaCl ₂	
10 ml 1 M Kohlenstoffquelle	
1 ml 70 mM FeSO ₄	
1 ml 0,2 mM (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	

Dieses Minimal-Medium wurde verwendet, um *P. aeruginosa* auf folgenden ungewöhnlichen Kohlenstoffquellen zu selektieren: Benzoesäure, Diaminopimelinsäure, Mannitol oder Tyrosin. Die Endkonzentration betrug jeweils 10 mM.

MM-Medium

DAVIS & MINGIOLI (1950)

875 ml H ₂ O dest.	
50 ml Salzlösung	Salzlösung:
50 ml 10 % (w/v) Glukose	800 mM K ₂ HPO ₄
10 ml 760 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	265 mM KH ₂ PO ₄
10 ml 5 % (w/v) Na-Citrat	
5 ml 80 mM MgSO ₄	

Hiermit erfolgte die Selektion der Gen-Marken: *aro*, *pyr* und *pur* durch Zusatz eines Gemisches aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin), von Uracil oder Adenin; je in einer Endkonzentration von 1 mM.

Agar-Platten

15 g Agarpulver (Difco) pro 1000 ml des entsprechenden Mediums

Weichagar (allgemein)

5 g Agarpulver (Difco) pro 1000 ml Medium

Weichagar zur Selektion
rekombinanter M13 Phagen

MANIATIS et al. (1982)

1,0 g Trypton (Difco, Oxoid)
0,25 g Hefeextrakt (Difco, Oxoid)
0,5 g NaCl
0,7 g Agarpulver (Difco)
ad 100 ml H₂O dest.

Vor Gebrauch wurde frisch dazugemischt:

0,33 ml 100 mM IPTG, gelöst in 70 % Ethanol
1,7 ml 2 % X-Gal, gelöst in Dimethylformamid

Spezielle Indikator-Agarplatten

Calcium-Triolein-Agarplatten (CT-Agar) WOHLFARTH & WINKLER (1988)

Lsg. 1: 450 ml NB- / LB- oder Minimalagar
5 ml 1 % (w/v) CaCl₂ x 2H₂O

Lsg. 2: 45 ml H₂O dest.
5 ml Olivenöl (gereinigt über eine Al₂O₃-Säule)

Lsg. 2 wurde 15 min auf einem Magnetrührer kräftig gemischt, in Lsg. 1 überführt und weitere 5-10 min gerührt, während der pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,5 eingestellt wurde. Alle Manipulationen erfolgten steril. Das Olivenöl bildete kleine Tröpfchen an der Agaroberfläche.

Tween 80-Agarplatten

HOWE & WARD (1976)

500 ml NB-Agar

5 ml Tween 80 (gereinigt über eine Al_2O_3 -Säule)5 ml 1 % (w/v) $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Das Tween 80 wurde ohne Schlierenbildung gleichmäßig eingemischt.

Gelatine-Agarplatten

GERHARDT et al. (1981)

500 ml NB-Agar

2 g Bacto-Gelatine (Difco)

Elastin-Agarplatten

500 ml NB-Agar

1,5 g Elastin (krist.)

Die nicht löslichen Elastinkristalle wurden homogen in den Agar eingemischt.

Protein-Agarplatten

GERHARDT et al. (1981)

200 ml NB-Agar (doppelt konzentriert)

200 ml 10 % Magermilch (Skim-Milk, Difco)

Die Magermilch wurde 15 min bei 200 kPa autoklaviert und dann mit dem NB-Agar zu gleichen Teilen vermischt.

Lecithin-Agarplatten

GERHARDT et al. (1981)

250 ml NB-Agar

1 Eigelb (steril)

Das Eigelb wurde zu einem homogenen, trüben Medium eingemischt.

Fluoresceinproduktions-Agarplatten GERHARDT et al. (1981)

500 ml NB-Agar

0,75 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Der pH-Wert wurde mit 4 M HCl auf 6,0 eingestellt.

Pyocyaninproduktions-Agar (PAP) GERHARDT et al. (1981)

20,0 g Bacto-Pepton (Difco)

10,0 ml 86 %iges (v/v) Glycerin

10,0 g K_2SO_4

1,4 g MgCl_2

13,6 g Agarpulver (Difco)

ad 1000 ml H_2O dest.

Das Agarmedium wurde in Portionen zu je 8 ml in Reagenzgläser abgefüllt und zum Ersteifen schräg gelegt.

α -Komplementations-Agarplatten MANIATIS et al. (1982)

300 ml LB-Agar

1 ml 100 mM IPTG, gelöst in 70 % Ethanol

5 ml 2 % X-Gal, gelöst in Dimethyl-
formamid

} frisch angesetzt

API 20 NE-Testsystem

zur Identifizierung Gram-negativer Bakterien, die nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören.

Die acht konventionellen und zwölf Assimilations-Tests wurden nach Vorschrift der Vertreiberfirma (api-bioMerieux, Nürtingen) durchgeführt und ausgewertet.

2.3. Puffer und Lösungen

Hier werden nur häufig verwendete Puffer und Lösungen aufgeführt, Spezialansätze finden sich in den zugehörigen Methoden-Abschnitten.

Für mikrobiologische und biochemische Methoden

P-Puffer	40 mM Na_2HPO_4	
	KH_2PO_4	pH 6,0
	34 mM NaCl	
PBS	100 mM Na_2HPO_4	
	KH_2PO_4	pH 7,2
	154 mM NaCl	
Sørensen-Puffer	50 mM Na_2HPO_4	
	KH_2PO_4	pH 8,0
MOPS-Puffer	500 mM MOPS	pH 6,5 /
	pH Einstellung:	pH 7,3 /
	10 M, 1 M NaOH	pH 8,0
Tris-HCl-Puffer	1 M Tris	pH 7,2 -
	pH Einstellung:	pH 8,5
	konz. HCl	
	Puffer geringerer Molarität wurden hieraus verdünnt	
Probenpuffer für PAGE (5 x konz.)	62,5 mM Tris-HCl	pH 6,8
	10 % (v/v) Glycerin	
	0,001 % (w/v) BPB	
	2 % (w/v) SDS	
	5 % (v/v) Mercaptoethanol	

Für kreuzungsgenetische Methoden

TNM-Puffer	10 mM Tris-HCl	pH 7,4
	150 mM NaCl	
	10 mM MgSO ₄	

Für molekulargenetische Methoden

TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl	pH 8,3
	89 mM Borsäure	
	2,5 mM NA ₂ -EDTA x 2H ₂ O	

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl	pH 8,0
	1 mM NA ₂ -EDTA	

TE-Puffer (Sequenzierung)	10 mM Tris-HCl	pH 8,0
	0,1 mM NA ₂ -EDTA	

TM-Puffer	100 mM Tris-HCl	pH 8,0
	50 mM MgCl ₂	

Lösungen für BIRNBOIM & DOLY (1979)

Plasmid-Präparationen

Lsg. 1	25 mM Tris-HCl	pH 7,5
	10 mM NA ₂ -EDTA	
	50 mM Glukose	
	2 mg/ml Lysozym	

Lsg. 2	0,2 M NaOH
	1 % SDS

Lsg. 3	3 M Na-Acetat	pH 4,8
--------	---------------	--------

Puffer für DNA-Enzymreaktionen	Die Enzympuffer entsprachen den Vorschriften der jeweiligen Enzym-Hersteller.
Farbmarker für Agarosegele	2,0 ml 250 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 2,5 ml 86 %iges Glycerin 0,5 ml BPB (5 mg/ml H_2O)
Farbmarker für Sequenzgele	100 ml Formamid 100 mg Xylene Cyanol 100 mg BPB 5 ml 200 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
Ethidiumbromid Färbelösung	0,5 % (w/v) Ethidiumbromid in H_2O
Phenol-Chloroform- Suspension	50 % Phenol (TE gesättigt) 50 % Chloroform je (v/v)

2.4. Enzyme und Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien p. a. der Firmen Merck AG, Darmstadt und Riedel de Haën AG, Seelze verwendet. Spezielle Enzyme und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

<u>Enzyme</u>	<u>Herkunft</u>
alkal. Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH,
DNA-Polymerase I (Klenow Frag.)	Mannheim
Lysozym	
RNase A	
S1-Nuklease	
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim und Bethesda Research Laboratories, Maryland (USA)

T4 DNA-Ligase

Bethesda Research Laboratories,
Maryland (USA)

Sequenase

Renner, Dannstadt

Chemikalien

³⁵S-dATP (0,25 MBq/µl)
 Butanol, Chloroform, CsCl,
 Ethanol, Isopropanol, Phenol
 DTT, IPTG, X-Gal
 Desoxynukleotide, Didesoxy-
 nukleotide, 7-Deaza-dGTP,
 Tris, Triton X-100
 Benzoesäure, TEMED
 SDS
 Manucol LB

Acrylamid (2 x krist.), Bis-
 acrylamid, Amberlite, p-Nitro-
 phenylpalmitat, Palmitoyl-CoA
 Trimyristin, Ammoniumpersulfat
 Coomassie Brilliant Blue G-250
 Ethidiumbromid, DTNB
 Agarose (Grade II), Antibioti-
 ka, Elastin, N-Lauroylsarcosin,
 Olivenöl, Protein-MW-Marker für
 PAGE, Tween 80
 17er-Sequenzierungsprimer
 (5'-GTAAACGACGGCCAGT-3')
 Saccharose

Herkunft

Amersham-Buchler, Braunschweig
 Baker Chemicals B. V., Deventer
 (NL)
 Biomol, Ilvesheim
 Boehringer Mannheim GmbH,
 Mannheim

Fluka AG, Buchs (CH)
 Janssen Chimica, Beerse (B)
 Kelco-AIL-International GmbH,
 Hamburg
 Serva Feinbiochemika,
 Heidelberg

Sigma Chemie GmbH, München

Renner GmbH, Dannstadt und
 Arbeitsgr. Prof. Hengstenberg,
 RUB

C. Roth, Karlsruhe

2.5. Geräte

Zentrifugen

- Tischzentrifuge Eppendorf 5414S (max. 15600 xg)
- Tischzentrifuge Christ Junior O (max. 3800 xg)
- Kühlzentrifuge Sorvall RC2-B und RC-5B; Rotoren: SS 34, GSA, GS-3
- Ultrazentrifuge Kontron TGA-65; Rotor: 60 Ti

Spannungsgeräte

- Hölzel (max. 100 mA, 900 V)
- Consort (max. 150 mA, 3000 V)

sonstige Geräte

- Ultraschallgerät Branson B-12 und 250
- Rundschüttler New Brunswick Scientific G10 Gyrotory Shaker
- Spektralphotometer Zeiss PMQ II
- Bio-Luminescence Sample-Unit, PTL-Meerkeim
- Chromato-VUE-Transluminator
- Polaroid-Kamera, Gelbfilter; Film: Polaroid 665
- Geltrockner, BioRad 483

Mikrobiologische und biochemische Methoden

2.6. Anzuchten

2.6.1. Bakterienanzuchten

Je nach Fragestellung variierten die Anzuchtbedingungen. Normalerweise wurden die *Pseudomonaden* in NB-Vollmedium bei 30°C oder 37°C angezüchtet. Die *E. coli*-Stämme wurden in LB-Vollmedium bei 37°C bebrütet. Zusätzlich wurden plasmidtragende Stämme immer unter Selektionsdruck gehalten. Kulturvolumina kleiner als 10 ml wurden im Brutroller, größere Ansätze bei wenigstens 180 rpm auf einem Rundschüttler (2.5.) belüftet. Als Übernachtskulturen wurden solche Ansätze bezeichnet, die wenigstens 16 h inkubiert wurden.

Die Stammhaltung erfolgte auf entsprechenden Vollagarplatten, sie

wurden jeden Monat erneuert und zwischenzeitlich bei 4°C gelagert. Gefrierkulturen in 50 % Glycerin unterstützten die Stammkonservierung.

2.6.2. Phagenanzuchten und Lysatgewinnung ADAMS (1959)

Die Vermehrung und Titerbestimmung der *P. aeruginosa*-Phagen erfolgte nach einer Weichagar-Gußplatten-Methode. Mit einer Multiplizität von 0,005 wurden die Phagen bei 37°C 15 min an *Pseudomonas*-Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur (5×10^8 Zellen pro ml) adsorbiert. Die infizierten Zellen wurden in Weichagar auf frischen NB-Agarplatten bis zur konfluenten Lyse bebrütet (37°C). Zur Ernte ließ man die Phagen aus dem separierten Weichagar, gemischt mit 0,5 ml TNM-Puffer (pro Platte; 2.3.), während einer Inkubation von 20 min bei RT herausdiffundieren und trennte sie anschließend durch Zentrifugation (12000 xg, 10 min, 4°C) von Zellen und Agarresten ab. Das über einen Sartorius Filter (0,45 µm Porendurchmesser) vollständig von Bakterien befreite Lysat wurde in Gegenwart von Chloroform bei 4°C aufbewahrt und zur Bestimmung der PFU (= Plaque-bildende Einheit) in geeigneter Verdünnung auf demselben Bakterienwirt getitert.

Die Präparation von M13-DNA wurde unter 2.22. beschrieben.

2.7. Isolierung von Mutanten WINKLER et al. (1972)

Lipase-negative Mutanten von *P. aeruginosa* PAO2302 wurden nach Mutagenbehandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (Nitrosoguanidin, NG) erhalten. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) bebrütet, die Zellen geerntet (Tischzentrifuge, 10 min, RT) und in P-Puffer pH 6,0 (2.3.) auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Zur Mutagenisierung wurde dem Ansatz NG (gelöst in P-Puffer pH 6,0) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugemischt und bei 37°C und mäßiger Belüftung 7 min inkubiert. Diese Inkubationszeit, bei der 15 % der Bakterienzellen überlebten, wurde in zeitabhängigen Vorversuchen als optimal ermittelt. Der Reaktionsstopp wurde durch ein Ausverdünnen (10^{-1}) des Mutagens in einem großen Volumen kalten P-Puffers be-

wirkt. Aus diesem Verdünnungsschritt wurden mehrere NB-Vollagarplatten mit je ca. 10^5 Zellen/Platte angelegt und bei 37°C bebrütet. Der entstandene Bakterienrasen wurde in 1 ml NB-Flüssigmedium gut suspendiert und zum Beimpfen einer frischen NB-Kultur mit 2×10^8 Zellen/ml verwendet. Nach erfolgter Segregation (ca. 1-3 Bakterien-Teilungen) wurden auf mehrere NB-Agarplatten jeweils ca. 250 Zellen ausplattiert und die entstandenen Kolonien anschließend auf CT-Indikatoragar (2.2.) differenziert.

2.8. Nachweis von Exoprodukten in Plattentestverfahren

Die unter 2.2. beschriebenen speziellen Indikator-Agarplatten wurden mit 5 mm breiten Impfstrichen der zu testenden Mutanten versehen und 1-2 d bei 30°C bebrütet. Die Bewertung der Platten fand nach folgendem Schema statt:

<u>Nachweis von</u>	<u>positives Ergebnis</u>
Lipase	auf CT-Agarplatten weißes Präzipitat von Ca-Oleat in den Öltröpfchen des Impfstriches und in seiner Umgebung
Esterase	auf Tween 80-Agarplatten weiß-gelbliche, nadelfeine Kristalle (Ca-Oleat) unter und neben dem Impfstrich
Gelatinase	auf Gelatine-Agarplatten nach Zugabe des Nachweisreagenzes (0,5 M H_2SO_4 gesättigt mit Na_2SO_4); klare Hydrolyse-Zone um den Impfstrich
Elastase	auf Elastin-Agarplatten Hydrolyse der nicht löslichen Elastin-Kristalle, klare Zone um den Impfstrich

Proteinase (allgem.)	auf Protein-Agarplatten klare Hydrolyse-Zone um den Impfstrich
Lecithinase	auf Lecithin-Agarplatten weißes Präzipitat unter dem Impfstrich, das sich deutlich vom gelblich-trüben Medium abhebt
Fluorescein- produktion	auf Fluoresceinproduktions-Agarplatten im UV-Licht (265 nm) starke gelbe Fluoreszenz
Pyocyanin- produktion	auf Pyocyaninproduktions-Schrägagar intensive Färbung: dunkelrot, braun, dunkelgrün, blaugrün

2.9. Beeinflussung der extrazellulären Lipase(aktivität)

2.9.1. Zugabe von exogenem Alginat oder Olivenöl

Die zu testenden Mutanten wurden im Brutroller 16-18 h bei 30°C angezüchtet. Dem NB-Vollmedium waren entweder 0,2 % (w/v) gereinigtes Alginat (Manucol LB, gereinigt von Dr. J. Wingender, RUB-Bochum) oder 1 % (v/v) gereinigtes Olivenöl zugegeben. Als Kontrollen dienten Anzuchten ohne Zusätze.

2.9.2. Einfluß von Triton X-100

STÖER, pers. Mitteilung

In M9-Minimalmedium gewachsene Bakterien einer Übernachtskultur wurden verwendet, um frisches M9-Minimalmedium mit 5×10^8 Zellen/ml zu beimpfen. Die Zellen der 6 h bei 30°C inkubierten Kultur wurden dann geerntet (8000 xg, 20 min, 4°C) und in 1/5 Volumen 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (2.3.) aufgenommen. Eine Hälfte des Ansatzes wurde zur Solubilisierung membranständiger Proteine in Gegenwart von 0,02 % (v/v) Triton X-100 45 min bei 30°C geschüttelt, der andere Teil des Ansatzes wurde als Kontrolle ohne Detergenz weiterbehandelt. Der anschließend durch Zentrifugation (s.o.)

und Sterilfiltration (Sartorius-Membranfilter) zellfrei gemachte (proteinhaltige) Inkubationspuffer beider Testansätze wurde 2 d gegen 20 l 10 mM NH_4HCO_3 dialysiert. Die Lipase-Aktivität der Präparate wurde photometrisch im p-Nitrophenylpalmitatstest (2.12. 1.) ermittelt und in Bezug zum Kontrollansatz gesetzt.

2.10. Phagenlysisstest

WINKLER et al. (1972)

Von den unter 2.1. aufgeführten *Pseudomonas*-Phagen (Titer: 10^8 - 10^{10} PFU) wurden serielle Verdünnungen in TNM-Puffer (2.3.) hergestellt. Je Verdünnungsstufe (bis 10^{-4} bzw. 10^{-6}) wurden 10 μl Proben auf NB-Agarplatten aufgetropft, die zuvor mit 0,2 ml einer in Weichagar eingemischten, stationären *Pseudomonas*-Kultur überschichtet wurden. Nach 1 d Bebrütungsdauer bei 37°C wurde das Lysevermögen der Phagen ausgewertet.

2.11. Gewinnung äußerer Membranen (OM) und Darstellung ihrer Komponenten

LAMBERT & BOOTH (1982)

Die verwendete Sarkosyl-Methode ermöglichte die Präparation von äußeren Membranen, deren Einzelkomponenten (LPS und Proteine) anschließend in geeigneten Gelsystemen getrennt dargestellt werden konnten.

Die *Pseudomonas*-Stämme wurden bei 37°C in 100 ml NB-Vollmedium bis zur spät-stationären Wachstumsphase bebrütet. Das einmal mit 100 ml PBS (2.3.) gewaschene Zellsediment wurde in 1/5 Volumen TE-Puffer (2.3.) aufgenommen und 5 x 30 sec bei 90 W beschallt. Die Desintegration der Zellen wurde durch Trübungsmessung im Spektralphotometer bei 580 nm verfolgt und ggf. bis zu einer Abnahme der optischen Dichte um 90 % fortgesetzt. Restliche intakte Zellen und große Zelltrümmer wurden niedertourig abzentrifugiert (5000 xg, 10 min, 4°C) und die Zellhüllen im Überstand dann mit dem Detergenz Sarkosyl (Endkonzentration: 2 % (w/v)) 30 min bei RT geschüttelt. Die abgelösten Zellmembranen konnten durch eine Zentrifugation bei 40000 xg (30 min, 4°C) sedimentiert werden. Sie wurden einmal mit H_2O dest. gewaschen und in 0,3-1,0 ml H_2O dest. bis zum Gebrauch

bei -20°C gelagert. Die Qualität des OM-Präparates wurde durch das Fehlen des cytoplasmatischen Enzyms Succinat Dehydrogenase bestimmt.

2.11.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von LPS

Probenvorbehandlung:

50 µl einer OM-Präparation (2.11.) wurden in Gegenwart von 12,5 µl SDS-haltigem Probenpuffer (2.3.) 10 min bei 90°C solubilisiert und die Proteine anschließend durch eine einstündige Verdauung mit Proteinase K (Endkonzentration: 0,5 mg/ml) bei 50°C entfernt. 10 µl dieses Ansatzes reichten für die gelelektrophoretische LPS-Darstellung aus.

Gelsystem:

mod. nach HAMES & RICKWOOD (1983)

Die PAGE erfolgte in einem Laemmli-Gelsystem, mit diskontinuierlichen Puffersystemen für Sammel- und Trenngel. Folgende Parameter wurden eingehalten:

Sammelgel	3 % Acrylamid, 0,08 % Bisacrylamid in 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS
Trenngel	12 % Acrylamid, 5 % Bisacrylamid in 375 mM Tris-HCl pH 8,8 70 mM NaCl 0,2 % (w/v) SDS
Elektrodenpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Gellauf	60 V Probenlauf im Sammelgel 120 V Probenlauf im Trenngel
Molekulargewichts- standards	Rinderserumalbumin (66.000), Ovalbumin (45.000), GAP-DH (36.000), Carbonsre. An- hydrase (29.000), Trypsinogen (24.000), Trypsin Inhibitor (20.100), Lactalbumin (14.200)

Färbung:

TSAI & FRASCH (1982)

Es wurde eine LPS-bevorzugende Silberfärbung durchgeführt. Das über Nacht fixierte Gel (40 % Ethanol, 5 % Essigsäure je(v/v)) wurde 5 min bei RT mit Perjodsäure (0,7 % ig in Fixierlösung) oxidiert und mit H₂O bidest. mehrmals sorgfältig gewaschen, bevor es 10 min bei RT gefärbt werden konnte. Die Färbelösung: 2 ml konz. NH₄OH, 28 ml 0,1 M NaOH, 5 ml 20 % (w/v) AgNO₃ ad 150 ml H₂O bidest. wurde vor Gebrauch frisch angesetzt. Zur Entfernung überschüssiger Silberlösung wurde das Gel 3 x 10 min mit H₂O bidest. gewaschen. Die Entwicklung erfolgte danach in einer wässrigen Lösung aus 0,05 % (v/v) Formaldehyd und 0,005 % (w/v) Zitronensäure. Dieser Vorgang war optisch sehr gut zu verfolgen und wurde durch mehrfaches Wässern gestoppt. Alle Reaktionsschritte wurden bei RT und konstantem Schütteln durchgeführt. Da die Methode ein sehr empfindliches Färbeverfahren darstellt, muß zur Vermeidung von Verunreinigungen mit H₂O bidest. (d.h. glasdestilliert) und mit Handschuhen gearbeitet werden.

2.11.2. Darstellung von OM-ProteinenProbenvorbehandlung:

100 µl OM-Präparation (2.11.) wurden zur Solubilisierung der Membranproteine mit 25 µl des SDS-haltigen Probenpuffers (2.3.) 10 min bei 90°C inkubiert. Die aufgetrennten Proben variierten in ihrem Volumen von 20 µl bis 80 µl.

Gelsystem:

Das hier verwendete Laemmli-Gelsystem unterschied sich vom Gelsystem der LPS-Auftrennung (2.11.1.) lediglich in der Vernetzung des Trenngels (14 % Acrylamid, 0,12 % Bisacrylamid).

Färbung:

Die Proteinbanden wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,1 %) in einer Lösung aus 25 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure 10 min bei 60°C angefärbt und dann in 25 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure (in H₂O dest.) über Nacht bei RT ausdifferenziert.

2.12. Enzym Tests

2.12.1. Lipase-Test, photometrisch (=pNPP-Test)

WINKLER & STUCKMANN (1979)

In diesem Nachweisverfahren dient emulgiertes p-Nitrophenylpalmitat (pNPP) als Substrat. Es wird bevorzugt durch Lipasen, aber auch unspezifisch durch Esterasen das bei 410 nm meßbare, gelbe p-Nitrophenol abgespalten.

Substratemulsion:

- Lsg. 1: 207 mg Na-desoxycholat
 100 mg Gummi arabicum
 gelöst in 90 ml Sørensen-Puffer, pH 8,0 (2.3.)
- Lsg. 2: 30 mg p-Nitrophenylpalmitat
 unter Erwärmung gelöst in 10 ml Isopropanol

Vor Gebrauch wurde die abgekühlte Lsg. 2 in Lsg. 1 eingerührt. Die entstandene Substratemulsion war 1 h im Dunkeln stabil.

Testansatz:

In 2,4 ml der vorgewärmten Substratemulsion (5 min bei 37°C) wurden 100 µl enzymhaltige Lösung eingemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wurde bei 410 nm im Spektralphotometer gegen einen enzymfreien Leerwert (Sørensen-Puffer) gemessen. Eine Enzymeinheit (EU_{pNPP}) Lipase setzt unter diesen Testbedingungen 1 nmol p-Nitrophenol pro ml und min frei.

Bei stark gelb oder grün gefärbten Überstandsproben wurde es notwendig, eine Farbkorrektur vorzunehmen: 2,4 ml Sørensen-Puffer pH 8,0 gemischt mit 100 µl Überstandsprobe wurden gegen einen Puffer-Leerwert gemessen und der erhaltene Wert als Farbquench von den Meßwerten subtrahiert.

2.12.2. Lipase-Test, bioluminometrisch ULITZUR (1979)

In einem spezifischen 2-Stufen-Test wird die enzymatisch aus Trimyristin freigesetzte Myristinsäure durch fettsäureabhängige Biolumineszens einer schwach leuchtenden, im Fettsäure-Reduktase-Komplex defekten Mutante von *V. harveyi* M17-LP nachgewiesen. Da ein

Teil des Tests mit ganzen Zellen durchgeführt werden muß, ist dieses System recht anfällig und eignet sich nicht als Routineverfahren. Es wurde nur zum Nachweis äußerst geringer Lipaseaktivitäten eingesetzt (Nachweisgrenze: 19 nmole Myristinsäure).

Zellgewinnung:

V. harveyi M17-LP wurde in ASW-MOPS-Medium (2.2.) bei 30°C bis zu einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml angezüchtet. Die einmal in ASW-MOPS-Puffer pH 6,5 (2.3.) gewaschenen Zellen wurden in gleichem Volumen desselben Puffers homogenisiert und bei 0°C aufbewahrt. Sie waren ca. 4 h im Test aktiv.

Testansatz Teil 1, enzymatische Reaktion:

1,4 ml des bei 37°C vorgewärmten ASW-MOPS-Puffers pH 8,0 (2.3.) wurden mit 15 µl einer 10 mM Trimyristinlösung (temperiert auf 37°C) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl enzymhaltiger Probe gestartet und nach 15 min bei 37°C durch Erhitzen (100°C, 5 min) gestoppt. Aus der abgekühlten Probe wurde anschließend das ausgefallene, nicht umgesetzte Trimyristin durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 4 min, RT) abgetrennt und der geklärte Überstand bei 0°C aufbewahrt.

Testansatz Teil 2, Biolumineszenz-Messung:

793 µl des Testansatzes aus Teil 1 wurden mit 7 µl 1 M HCl auf pH 6,5 titriert und in einer sauberen Petrischale (Ø 30 mm) auf RT angewärmt. Die Biolumineszenz-Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 ml der vorbereiteten, ebenfalls raumtemperierten Zellen von *V. harveyi* M17-LP gestartet und sofort die Zunahme der Biolumineszenz im Luminometer (2.5.) verfolgt. Der bei der Messung erreichte Höchstwert war der eingesetzten Lipaseaktivität proportional. Die Beziehung zwischen Lipaseaktivität und freigesetzter Myristinsäure einerseits und gemessener Biolumineszenz andererseits wurde über eine Eichkurve korreliert, die Hintergrundstrahlung jeweils separat bestimmt und als Korrekturfaktor einbezogen. Die hier zu definierende Enzymeinheit: $1 \text{ EU}_{\text{Lum}} = 1 \text{ nmol Myristinsäure} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

2.12.3. Esterase-Test, photometrisch OHKAWA et al. (1979)

900 μ l vorgewärmte Substratlösung (25 μ M Palmitoyl-CoA, 0,5 mM DTNB in 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5) wurden mit 100 μ l Probe bei 37°C inkubiert. 4 min wurde der Reaktionsablauf im Photometer bei 412 nm verfolgt. Eine Enzymeinheit (EU_{Est}) setzt 1 nmol Palmitoyl-CoA pro min und ml um.

2.12.4. Succinat Dehydrogenase-Test, photometrisch MIZUNO & KAGEYAMA (1978)

Der Test wurde nach obiger Literaturvorschrift durchgeführt. Die enzymatische Reaktion wurde 10 min bei RT im Photometer (600 nm) verfolgt.

2.13. Zelldichte- und Zellzahlbestimmung

Für viele Fragestellungen reichte es aus, die Zelldichte durch Trübungsmessung im Photometer zu bestimmen. Bei Extinktionswerten größer 0,3 wurden entsprechend verdünnte Proben gegen unbewachsene Nährlösung als Leerwert gemessen. *E. coli*-Kulturen wurden bei 600 nm oder 450 nm, *P. aeruginosa*-Kulturen bei 580 nm betrachtet. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

Kreuzungsgenetische Methoden

2.14. Konjugationen

Donor- und Rezipientenzellen wurden getrennt bei 37°C in NB-Vollmedium zu einer Zelldichte von je 5×10^8 Zellen/ml angezüchtet. Alle weiteren Versuchsschritte wurden bei 37°C mit entsprechend temperierten Medien und Geräten durchgeführt. Als Kontrolle diente die separate Kultivierung von Donor- und Rezipientenzellen auf den entsprechenden Selektivmedien.

2.14.1. Plasmid FP5

modif. nach MATSUMOTO et al. (1981)

Die Konjugationspartner wurden in Volumenverhältnissen von 1:1, 1:2 und 1:5 (Angaben jeweils in ml) vorsichtig vereinigt und als dünner Film in entsprechend großen Erlenmeyerkolben (100 ml, 250 ml und 500 ml) 3 h erschütterungsfrei (37°C) inkubiert. Die Konjugation wurde durch Zentrifugation der Ansätze (Tischzentrifuge, 10 min, 37°C) gestoppt und die gesammelten Zellen im gleichen Ausgangsvolumen in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung aufgenommen. Davon wurden 0,1 ml Aliquots auf entsprechende Selektivmedien ausplattiert und bei 37°C bebrütet.

2.14.2. Plasmid R68.45

modif. nach STANISICH & HOLLOWAY (1972)

Die Konjugation mit Plasmid R68.45 ist nur an einer festen Matrix durchzuführen. Aus den exponentiell-wachsenden Donor- und Rezipientenkulturen wurden die Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15 min, 37°C) abgetrennt und in 0,9 % iger NaCl-Lösung um den Faktor 12 auf jeweils 6×10^9 Zellen/ml konzentriert. Diese Bakteriensuspensionen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und in Aliquots zu 0,2 ml auf Selektivmedien ausplattiert und bei 37°C bebrütet.

2.15. Transduktion

modif. nach MATSUMOTO et al. (1981)

Die Vermehrung des transduzierfähigen *Pseudomonas*-Phagen G101 erfolgte wie unter 2.6.2. beschrieben, wobei ein zweifacher Vermehrungszyklus auf demselben Wirt durchlaufen wurde. Die in der Transduktion eingesetzten *P. aeruginosa*-Stämme wurden bis zur exponentiellen Wuchsphase (5×10^8 Zellen/ml) bei 37°C in NB-Vollmedium bebrütet und dann in TNM-Puffer (2.3.) auf 1×10^9 Zellen/ml eingestellt. Phagen und Zellen wurden mit einer Multiplizität von 5 oder 7 (Gesamtvolumen: 2 ml) 20 min bei 37°C präadsorbiert, auf 1/10 Volumen in TNM-Puffer konzentriert und in Aliquots zu 0,1 ml auf Selektivmedien bei 37°C inkubiert. Kontrollplatten enthielten nur Bakterienzellen oder Phagenlysate.

Molekulargenetische Methoden

Klonierung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die hier aufgeführten Methoden nach MANIATIS et al. (1982) modifiziert.

2.16. Methoden zur DNA-Isolierung

2.16.1. Gewinnung chromosomaler DNA

Zur Isolierung der chromosomalen DNA von *P. aeruginosa* PAO1 wurden in kaltem TE-Puffer pH 8,0 (2.3.) gewaschene Zellen einer stationären Kultur (ca. 5×10^9 Zellen/ml) verwendet. Die Bakterien wurden in 1/7 Volumen einer 10 % igen Saccharoselösung (in TE-Puffer) mit 1 mg/ml Lysozym 10 min bei RT vorbehandelt. Dann wurde 1/14 Volumen Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 % Brij-58; 0,4 % Na-desoxycholat) eingemischt und nach 10 min (RT) die freigesetzten Proteine durch 500 µg/ml Pronase E bei 37°C verdaut (45 min). Aus diesem Gemisch wurden die Zelltrümmer sedimentiert (12000 xg, 30 min, 4°C) und die DNA des viskösen Überstandes durch eine Iso-propanolfällung zu einem fädigen Gespinnst präzipitiert. Die anschließende Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Gradienten (2.18.1.) schloß die Reinigung ab.

2.16.2. Plasmidpräparationen

BIRNBOIM & DOLY (1979)

Die alkalische SDS-Lyse der Bakterienzellen zur gezielten Freisetzung der Plasmid-DNA war sowohl für die Gewinnung von Plasmiden aus *E. coli* als auch *P. aeruginosa* erfolgreich.

Präparative Aufarbeitungen:

<i>E. coli</i> -Vektoren	amplifizierbar	aus	0,5 l	Kultur
	nicht amplifizierbar	aus	1,0 l	Kultur
<i>P. aeruginosa</i> -Vektoren	nicht amplifizierbar	aus	4,0 l	Kultur

Analytische Aufarbeitungen: (Mini-Präps)Plasmide aus *E. coli*

aus 1,5 ml Kultur

Plasmide aus *P. aeruginosa*

aus 10,0 ml Kultur

Die Aufarbeitungsmethode war in allen Fällen gleich, unterschiedliche Volumina der einzelnen Reagenzien richteten sich proportional nach den Ausgangsvolumina der aufzuarbeitenden Anzuchten. Bakterien mit den zu präparierenden Plasmiden wurden in Vollmedium unter Selektionsdruck (Zugabe eines Antibiotikums) angezüchtet. Die stationäre Kultur mit ca. $2-5 \times 10^9$ Zellen/ml wurde geerntet (12000 xg, 10 min, 4°C) und die Zellen in 1/10 Volumen Lsg. 1 (2.3.), der frisch 2 mg/ml Lysozym zugesetzt wurden, innerhalb von 10 min bei RT sphäroplastiert. Der eigentliche Zellaufschluß erfolgte nach Zugabe von 1/5 Volumen Lsg. 2 (2.3.) während einer Inkubation von 10 min bei 0°C. Abschließend wurde durch Hinzufügen von Lsg. 3 (2.3.) (1/6,7 Volumen) innerhalb einer halben Stunde bei 0°C ein Großteil der chromosomalen Bakterien-DNA ausgefällt, die im anschließenden Zentrifugationsschritt (35000 xg, 4°C, bei präp. Aufarbeitungen) quantitativ von der im Überstand befindlichen Plasmid-DNA abgetrennt wurde. Zur Konzentrierung der Plasmid-DNA wurde bei Großanzuchten eine Isopropanolfällung, bei analytischen Präparaten eine Ethanol-fällung angeschlossen (2.17.). Weitere Reinigungsschritte richteten sich nach der Verwendung der Plasmide.

Anmerkungen:

Plasmide mit relaxierter Replikationskontrolle wurden durch die Zugabe von 250 µg/ml Chloramphenicol zu exponentiell-wachsenden Zellen (5×10^8 Zellen/ml) amplifiziert. Die selektive Plasmid-DNA-Replikation wurde über 16 h fortgesetzt.

Alle Zentrifugationsschritte der Ansätze > 10 ml wurden in einer Sorvall-Kühlzentrifuge (2.5.) durchgeführt, die Kleinansätze wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (2.5.) präzipitiert.

2.17. Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung von DNA-Lösungen wurde die Nukleinsäure durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 und 2 Volumen Ethanol (abs.) bzw. 1 Volumen Isopropanol bei großen Testansätzen und Ein-

frieren bei -80°C (15 min) ausgefällt. Sie wurde durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 10 min, RT oder Sorvall-Kühlzentrifuge, 15000 xg, 30 min, 4°C) gesammelt und zur Entfernung überschüssiger Salze zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die im Vakuum getrocknete DNA konnte dann in TE-Puffer pH 8,0 (2.3.) auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

2.18. Reinigung von Nukleinsäuren

2.18.1. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Die in präparativen Aufarbeitungen (Plasmide und chromosomale DNA) gewonnene DNA wurde in ethidiumbromidhaltigem (0,4 mg/ml) TE-Puffer pH 8,0 (2.3.) auf eine mittlere CsCl-Dichte von $1,55\text{ g/cm}^3$ eingestellt. Bei dieser Salzkonzentration ausfallendes Protein wurde in einer Vor-Zentrifugation (12000 xg, 15 min, 15°C) abgetrennt. Die eigentliche Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 100000 xg über 40 h bei 15°C , wobei die Plasmid-DNA bei einer höheren CsCl-Dichte bandierte als die chromosomale DNA. Die im UV-Licht sichtbare Nukleinsäure wurde durch eine weite Injektionsnadel aus dem Zentrifugenbecher abgesaugt und zur Entfernung des interkalierten Ethidiumbromides mehrfach mit wassergesättigtem Butanol extrahiert. Das CsCl wurde in einer Dialyse gegen wenigstens 5 l TE-Puffer pH 8,0 (2.3.) entfernt und die gereinigte DNA nach Ethanolfällung in gewünschter Konzentration in TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

2.18.2. Extraktionen mit organischen Verbindungen

Eine wässrige DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit TE-gesättigtem, neutralisiertem Phenol vermischt. Je höher das Molekulargewicht der DNA war, um so vorsichtiger mußte dabei vorgegangen werden. Die Extraktion der Proteine in die organische Phase erfolgte 5 min bei RT, zur Phasentrennung wurde die Probe 1 min bei 0°C inkubiert und dann zentrifugiert. Die wässrige, DNA-haltige Oberphase wurde abgenommen. Eine vollständige Entfernung von Phe-

nol wurde durch zweistufige Weiterbehandlung mit den Extraktionsgemischen Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gewährleistet.

2.19. in vitro Rekombination von DNA

2.19.1. DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme wurden nach Vorschrift der Hersteller eingesetzt. Die Inkubationen erfolgten normalerweise 1 h bei 37°C, Ausnahmen bildeten die Versuchsbedingungen der Enzyme Bcl I (50°C), BstE II (60°C) und Sma I (25°C). Für partielle Hydrolysen wurde die Enzymkonzentration jeweils empirisch gefunden.

2.19.2. Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation linearisierter Vektor-DNA zu vermeiden, wurde sie mit alkalischer Phosphatase inkubiert. 75 Einheiten des Enzyms dephosphorylierten innerhalb von 30 min bei 37°C ca. 10-20 µg Vektor-DNA mit überhängenden Enden (sticky ends), DNA mit glatten Enden (blunt ends) mußte unter gleichen Bedingungen zweimal behandelt werden. Das Enzym wurde dann durch zwei Phenol- und Phenol/Chloroform-Extraktionen (2.18.2.) entfernt.

2.19.3. Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Gesamtvolumen von 15 µl wurden DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden innerhalb von 4 h bei 15°C durch 1,5 Einheiten T4 DNA-Ligase verknüpft. Der verwendete Ligationspuffer enthielt 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 1 mM DTT; 5 % (w/v) Polyethylenglycol-8000. Das Mengenverhältnis von Vektor-DNA (0,2-1,0 µg) und einzuligierender Fragment-DNA (0,1-1,0 µg) betrug 1:2 bis 1:7. Kontrollansätze enthielten entweder kein Ligaseenzym (Überprüfung der Religation) oder keine Fragment-DNA (Überprüfung des Vektors).

2.20. Transformation von Bakterienzellen

2.20.1. Transformation von *P. aeruginosa* OLSEN et al. (1982)

Herstellung kompetenter Zellen:

Die Zellen einer *P. aeruginosa*-Kultur mit genau 2×10^8 Zellen/ml wurden zweimal in $1/2$ Volumen eiskalter $MgCl_2$ -Lösung (150 mM) gewaschen und zwischen jedem Einzelschritt 5 bzw. 20 min bei $0^\circ C$ gehalten. Danach erlangten die Zellen in $1/10$ Volumen derselben Lösung über Nacht bei $4^\circ C$ Kompetenz. Die notwendigen Zentrifugationsschritte wurden bei 12000 xg, 10 min, $4^\circ C$ durchgeführt.

Transformation:

200 μl kompetente Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA gemischt und 60 min bei $0^\circ C$ inkubiert. Die Menge eingesetzter DNA richtete sich nach ihrer Zustandsform: 1-10 μg linearisierte DNA in Form eines Ligationsgemisches, 0,1-1 μg ccc-DNA einer Plasmidpräparation. Es folgte ein Hitzeschock von 5 min bei $42^\circ C$, dann wurde der Ansatz erneut auf $0^\circ C$ (5 min) abgekühlt. Zur phänischen Expression der übertragenen Antibiotikaresistenzen wurde jeder Transformationsansatz in 5 ml NB-Vollmedium eingemischt und bei $37^\circ C$ 2,5 h bebrütet. Die Zellen wurden dann um den Faktor 10 konzentriert (Tischzentrifuge, 15 min, RT), in Teilen zu 0,1 ml auf Selektivagar ausplattiert und bei $37^\circ C$ kultiviert. Als Kontrolle diente die Anzucht kompetenter Zellen auf demselben Selektivmedium.

2.20.2. Transformation von *E. coli* modif. nach COHEN et al. (1972)

Herstellung kompetenter Zellen:

Zellen der exponentiellen Wachstumsphase (0,6-0,8 bei O.D.₄₅₀) wurden sedimentiert (12000 xg, 10 min, $4^\circ C$) und in $1/10$ Volumen 10 mM $MgSO_4$ (kalt) 30 min bei $0^\circ C$ inkubiert. Nach erneutem Sammeln (s. o.) wurden die Zellen in $1/100$ Volumen 75 mM $CaCl_2$ -Lösung (kalt) während 1 h bei $0^\circ C$ auf Grund von Membrandestabilisierung kompetent gemacht.

Transformation:

100 µl kompetente Zellen, gemischt mit 0,1-1 µg DNA, wurden 30 min bei 0°C gehalten, dann schloß sich ein Hitzeschock von 10 min bei 42°C an. Zur phänischen Expression mußten die Zellen in 5 ml LB-Vollmedium 1-1,5 h bei 37°C bebrütet werden, die anschließende Selektion wurde wie bei *P. aeruginosa* (2.20.1.) durchgeführt.

2.21. Agarosegele

2.21.1. Agarosegelelektrophorese

Diese Standardmethode diente sowohl der Analyse als auch Isolierung von DNA-Fragmenten. Je nach Fragmentgröße wurde eine Matrix aus 0,9-1,5 % (w/v) Agarose verwendet. Die DNA-Proben wurden vor der Auftrennung mit 1/3 Volumen Probenpuffer (2.3.) gemischt, als Laufpuffer diente TBE (2.3.). Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Apparatur (18 cm x 10 cm x 0,5 cm) bei konstanter Stromspannung von 120 V durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandards wurden EcoR I- und EcoR I/Hind III-Fragmente von λ -DNA oder Hpa II-Fragmente von M13-DNA eingesetzt. Zur Darstellung der DNA-Fragmente im Gel wurde dieses 20 min in einer Lösung aus 0,5 mg/ml Ethidiumbromid bei RT gefärbt, gründlich gewässert und die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht. Bei Bedarf wurden die Gele mit einer Polaroid-Kamera mit Gelbfiltervorsatz (2.5.) fotografiert.

2.21.2. Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das mit Ethidiumbromid angefärbte DNA-Fragment wurde aus dem Gel als Agarosestreifen herausgeschnitten und zusammen mit ca. 0,5-1 ml TBE-Puffer (2.3.) in einen Dialyseschlauch überführt. In einer mit TBE-Puffer gefüllten horizontalen Gelkammer wurde die Elektrophorese während 2 h bei 300 V (100 mA) ausgeführt. Um danach die herausgelöste DNA wieder vom umgebenden Dialyseschlauch abzulösen, wurde für 30 sec die Richtung des Stromflusses geändert. Die resultierende DNA-haltige Lösung wurde durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 10 min, RT) von restlicher Agarose befreit

und vor Einengung durch Ethanolfällung (2.17.) in einer zweimaligen Phenol-, Phenol/Chloroform-Extraktion (2.18.2.) gereinigt.

Sequenzierung

2.22. Gewinnung von M13-DNA

2.22.1. Isolierung der replikativen Form (RF) der M13-DNA

Aus einer mit M13 infizierten *E. coli* JM109 Übernachtskultur wurden die Zellen sedimentiert (12000 xg, 10 min, 4°C), um den Überstand mit ca. $1-5 \times 10^{11}$ M13-Phagen/ml zu gewinnen. Dieses Lysat wurde verwendet, um 1000 ml einer in LB-Vollmedium exponentiell wachsenden Kultur (4×10^8 Zellen/ml) von *E. coli* JM109 zu infizieren (moi=10). Maximale Menge RF-DNA wurde während einer einstündigen Inkubation bei 37°C synthetisiert. Zellaufschluß und DNA-Isolierung erfolgten wie unter 2.16.2. beschrieben.

2.22.2. Isolierung von M13 (ss)-Einzelstrang-DNA; template-DNA

1,5 ml einer 1:100 in LB-Vollmedium verdünnten, stationären Bakterienkultur von *E. coli* JM109 wurden mit einem M13-Einzelplaque beimpft und die Phagen bei sehr guter Belüftung innerhalb von 6 h bei 37°C vermehrt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, 5 min, RT) abgetrennt und die im Überstand befindlichen Phagen durch eine 10 min-Inkubation bei RT mit 150 µl PEG-Lösung (25 % PEG; 3 M NaCl) und durch anschließende Zentrifugation (s. o.) konzentriert. Die in TE-Puffer pH 8,0 (2.3.) suspendierten Phagen wurden durch Zugabe des gleichen Volumens Phenol aufgeschlossen. Die freigesetzte DNA wurde dann durch zweifache Phenol/Chloroform-Extraktion (2.18.2.) gereinigt und nach Ethanolfällung (2.17.) in 20 µl TE-Sequenzierungspuffer pH 8,0 (2.3.) bei 0°C gelagert.

2.23. Isolierung von M13 "shot-gun" Klonen modif. nach DEININGER (1983)

Das zu sequenzierende, symmetrische DNA-Fragment wurde in beiden Orientierungen A und B (relativ zur "Primer-site") in die Sal I Restriktionsschnittstelle des Vektors M13mp18 kloniert (2.19.). Die Selektion rekombinanter (weißer) Klone erfolgte im α -Komplementationsweichagar (2.2.), die Orientierung der inserierten DNA wurde durch Hybridisierungsversuche (s. u.) ermittelt. Die Einzelstrang-DNA jeder der beiden hybriden Phagenklassen wurde aus 17 ml Kulturlösung (2.22.2.) gewonnen.

Ultraschallbehandlung:

Zur statistischen Fragmentierung wurde die Einzelstrang-DNA des Klones A mit 2,4 ml TE-Sequenzierungspuffer (2.3.) verdünnt, aufgeteilt und Ultraschallbehandlungen von 2-40 sec unterzogen (ca. 32 W). Jeder Ansatz wurde nach Ethanol-fällung (2.17.) auf 30 μ l TE-Sequenzierungspuffer pH 8,0 reduziert.

Hybridisierung:

Die beschallte DNA wurde zusammen mit gleicher DNA-Menge des unbeschallten, gegenläufigen Klones B gefällt (Ethanol-fällung 2.17.), je Ansatz in 40 μ l TE-Sequenzierungspuffer pH 8,0 aufgenommen und mit 5 μ l TM-Puffer (2.3.) die Hybridisierung 2 h bei 60°C durchgeführt. Die Gemische wurden innerhalb von 30 min auf RT abgekühlt.

S1-Verdauung:

Die ungepaarte Einzelstrang-DNA (vorwiegend der virale "+" Strang) wurde durch insgesamt 450 Einheiten des Enzyms S1-Nuklease während einer Inkubation von 40 min bei 37°C verdaut. Als Reaktionspuffer diente: 50 mM Na-Acetat pH 4,8; 200 mM NaCl; 1 mM ZnSO_4 ; 0,5 % (v/v) Glycerin. Das Enzym wurde nach Gebrauch durch mehrfache Extraktionen (2.18.2) entfernt und die Ansätze durch Ethanol-fällung (2.17.) auf je 30 μ l TE-Sequenzierungspuffer pH 8,0 eingestellt.

Größenfragmentierung:

Die Parallelansätze wurden in einem Agarosegel (2.21.1.) getrennt und DNA-Fragmente des Molekulargewichtsbereiches 300-800 bp durch Elektroelution (2.21.3.) isoliert. Als Molekulargewichts-

standard diente Hpa II fragmentierte M13mp18-DNA (18-1596 bp große Fragmente).

Reparatur der DNA-Enden:

Da die S1-Nuklease eine begrenzte Hydrolyseaktivität für Doppelstrang-DNA entwickelt, mußten diese Fehlstellen mit Desoxynukleotiden wieder aufgefüllt werden. Die nach der Elektroelution auf 60 µl (TE-Sequ.puffer pH 8,0) eingestellte DNA-Lösung wurde dazu mit 16 µl TM-Puffer und 30 µl "chase" (2.25.1.) in Gegenwart von 1 Einheit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) 30 min bei RT behandelt. Extraktionen (2.18.2.) und Ethanol-fällung (2.17.) schlossen diesen Präparationsabschnitt ab.

Selektion der Klone:

Die regenerierte Doppelstrang-DNA wurde mit Hinc II geschnittener, dephosphorylierter RF-DNA des Vektors M13mp18 ligiert (2. 19.) und in kompetente Zellen von *E. coli* JM109 transformiert (2. 20. 2.). Rekombinante, auf α -Komplementationsweichagar (2.2.) weiße Klone wurden zur Präparation von ss-Einzelstrang-DNA (template-DNA) für die Sequenzierungsreaktionen verwendet (2.22.2.).

2.24. Gewinnung von M13 Klonen für gezielte Sequenzierungen

Basis dieses Versuchsteiles waren die Ergebnisse der Restriktionsanalyse des Sal I-Fragments in pSW 101 (3.6.2.). Entsprechend der gefundenen Restriktionserkennungsstellen wurde die zu untersuchende DNA verdaut (Sal I/EcoR I und Sal I/Pst I; 2.19. 1.) und in homolog präparierte M13mp18-RF-DNA ligiert (2.19.).

2.25. DNA-Sequenzierung

SANGER et al. (1977)

Die Methode basiert auf einem statistisch eintretenden Kettenabbruch durch Einbau von Didesoxynukleotiden während der Komplementärstrangsynthese. Durch radioaktive Markierung mit ^{35}S -dATP können die neu synthetisierten Nukleotidketten nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

2.25.1. Sequenzierung mit Klenow-Enzym SANGER et al. (1977)

Primerhybridisierung:

An 5 µl ss-DNA (2.22.2.) wurde in einem Ansatz aus 3 µl H₂O und 1 µl TM-Puffer 1 µl Primer-DNA (0,5 ng/ml; 17er-Primer; 2.4.) hybridisiert. Nach 5 min bei 70°C wurde der Ansatz langsam (45 min) auf RT abgekühlt.

Kettenabbruchgemische:

modif. nach SANGER et al. (1977)

Mizusawa et al. (1986)

	T-Lsg.	C-Lsg.	G-Lsg.	A-Lsg.
dTTP	6	123	123	123
dCTP	123	6	123	123
7-Deaza-dGTP	123	123	6	123
dATP	--	--	--	0,2
ddTTP	240	--	--	--
ddCTP	--	50	--	--
ddGTP	--	--	100	--
ddATP	--	--	--	50

Alle Angaben in µM, die Lösungen wurden in TE-Puffer zur Sequenzierung pH 8,0 (2.3.) angesetzt. 7-Deaza-dGTP wurde in Hinblick auf die Analyse einer sehr G/C reichen DNA-Sequenz eingesetzt.

Sequenzierungsreaktion:

1. Markierung und Kettenabbruch: Für diesen Reaktionsansatz wurden je 2 µl folgender Lösungen vereinigt: Hybridisierungsgemisch (s. o.), DNA-Polymerase I Klenow-Fragment (0,1 Einheiten/µl) und entsprechendes Kettenabbruchgemisch A/C/G bzw. T, in die vor Gebrauch je ³²S-dATP eingemischt worden war (eingesetzte Radioaktivität pro Klon und Kettenabbruchgemisch: 0,037 MBq). Die Reaktion wurde 30 min bei 30°C oder 37°C durchgeführt.

2. Verlängerung: durch Zugabe von je 2 µl 250 µM "chase"-Lösung (enthält alle 4 Desoxynukleotide in einer Konzentration von 250 µM) wurde dieser Reaktionsabschnitt eingeleitet und 20 min bei 30°C ausgeführt.

3. Reaktionsstopp und Denaturierung: Durch Zugabe von 4 µl Farbmaler (2.3.) wurde die Reaktion beendet. Unmittelbar vor dem Auftragen der Probe auf ein Sequenzgel wurde die DNA 5 min bei 100°C

oder alternativ 2 min bei 75°C denaturiert. Bis zum Zerfall der Radioaktivität waren die Proben bei -20°C stabil.

2.25.2. Sequenzierung mit Klenow-Enzym, erweiterte Form

Focus, BRL (1987)

Hybridisierung:

Zwei Unterschiede bestanden zu 2.25.1.: Die Reaktion wurde nur 2 min bei 65°C in folgendem Puffer: 40 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl durchgeführt.

Kettenabbruchgemische:

	T-Lsg.	C-Lsg.	G-Lsg.	A-Lsg.
dTTP	25	250	250	250
dCTP	250	25	250	250
7-Deaza-dGTP	250	250	25	250
dATP	250	250	250	25
ddTTP	500	--	--	--
ddCTP	--	100	--	--
ddGTP	--	--	150	--
ddATP	--	--	--	300

Alle Angaben in µM.

Sequenzierungsreaktion:

1. Markierung und Verlängerung: Die 10 µl des Hybridisierungsansatzes wurden mit 2 µl Verlängerungs-Lösung (dCTP; dGTP; dTTP je 1,5 µM), 1 µl ³²S-dATP (≈ 0,37 MBq), 1 µl 100mM DTT und 2 µl DNA-Polymerase I Klenow-Fragment (0,5 Einheiten/µl) 7 min bei RT inkubiert.

2. Kettenabbruch: je 3,5 µl obigen Reaktionsgemisches wurden zu 2,5 µl aller 4 Kettenabbruchgemische (A/C/G bzw. T) gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert.

3. Reaktionsstopp und Denaturierung: vergleiche 2.25.1..

2.25.3. Sequenasereaktion

TABOR & RICHARDSON (1987)

Dieser Sequenzierungsansatz verlief prinzipiell wie eine erweiterte Klenow-Sequenzierung (2.25.2.). Sie basierte auf der verbesserten Polymeraseaktivität der veränderten T7-DNA-Polymerase. Statt 7-Deaza-dGTP wurde dITP verwendet, um die Analyse von G/C reicher DNA weiter zu erleichtern. Die einzelnen Reaktionsschritte wurden nach dem Versuchsprotokoll der Firma Renner durchgeführt, die alle notwendigen Lösungen als Set lieferte.

2.26. DNA-Sequenzgele

Die Analyse der Nukleotidsequenz erfolgte in denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen. 40 cm lange Gradientengele wurden zum Auftrennen der Sequenzierungsgemische aus 2.25.1. und 80 cm Gele bei Analyse der Reaktionsprodukte aus 2.25.2. und 2.25.3. eingesetzt, Breite (20 cm) und Dicke (0,05 cm) der Gele waren jeweils gleich. Die Gelplatten wurden vor Gebrauch entfettet und einseitig mit Dichlorsilan (2 % in Chloroform) beschichtet.

Gradientengele:

BIGGIN et al. (1983)

Die Gelmatrix bestand aus 6 % Acrylamid mit 46 % Harnstoff. Zur Ausbildung eines homogenen Puffergradienten wurden zwei Gellösungen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des Puffers TBE (2.3.) angesetzt waren (0,5 x TBE und 1 x TBE), im Volumenverhältnis 4,6:1 vorsichtig gemischt. Nach 2 h Polymerisationszeit bei RT war das Gel gebrauchsfertig. Die frisch denaturierten DNA-Sequenzierungsproben wurden darauf bei 35 W innerhalb von 2 h (Bromphenolblau des Farbmarkers hatte das Gel bereits verlassen) aufgetrennt. Das Puffersystem setzte sich dabei aus 0,5 x TBE Anoden- und 1 x TBE-Kathodenpuffer zusammen. Es wurde eine maximale Auflösung von ca. 150 lesbaren Nukleotiden erreicht.

Langlaufgele:

HELSBERG (1986)

Einfach konzentrierter TBE-Puffer wurde zum Ansetzen sowohl der Elektrodenpuffer als auch des Gels (6 % Acrylamid, 46 % Harnstoff) verwendet. Die Auftrennung der Nukleotidsequenzen (bis zu 400 Nukleotide lesbar) erfolgte über Nacht (12-16 h) bei 12 W.

Fixieren, Trocknen und Exponieren der Gele:

Die Gele wurden in einem wässrigen Gemisch aus 10 % (v/v) Essigsäure und 10 % (v/v) Methanol 15 min fixiert, auf Whatman 3MM Papier aufgezogen und anschließend in einem Gelrockner (2.5.) vollständig entwässert. Zur Autoradiographie wurden sie 20-50 h exponiert (Fuji-Röntgenfilm RX Medical).

2.27. Auswertung der Nukleotidsequenz

Die Nukleinsäuresequenzen wurden auf dem Großrechner Cyber 855 mit einem nach STADEN (1980) adaptierten Programm analysiert. Genaue Übersichten zu diesem Programm finden sich bei LAMM (1985).

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1. Calcium-Triolein Selektivmedium

Um eine Vielzahl von Bakterien einfach und schnell auf ihre Fähigkeit zur Produktion extrazellulärer Lipase untersuchen zu können, war es notwendig, ein spezifisches Plattentestverfahren zu etablieren. Bereits beschriebene Methoden, mit denen der Abbau des Detergenz Tween 80 (SIERRA, 1957) oder des Triglycerids Tributyrin (LAWRENCE et al., 1967) analysiert wurde, eigneten sich nicht, da auch Esterasen, so wie sie beispielsweise bei *P. aeruginosa* PAO1 zellgebunden (OHKAWA et al., 1979) zusätzlich zur extrazellulären Lipase vorkommen, diese Substrate unspezifisch hydrolysieren können. Ein spezifischer Fluoreszenztest, welcher aus Triolein abgespaltene Ölsäure in Verbindung mit Rhodamin nachweist (KOUKER & JÄGER, 1987), wurde erst publiziert, nachdem das hier zu beschreibende Verfahren erfolgreich eingesetzt worden war.

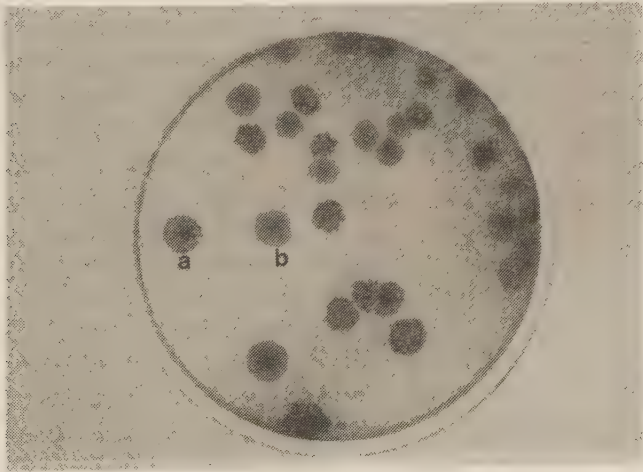


Abb. 1 CT-Selektionsagar auf Basis von NB-Vollmedium (2.2.)
zur Differenzierung von (a) *lip*⁺-Kolonien (PAO2302)
und (b) *lip*⁻-Kolonien (6-1)

Das Prinzip des CT-Agar-Nachweisverfahrens basiert auf zwei Voraussetzungen: Triolein wird ausschließlich von Lipasen gespalten (JENSEN, 1983) und die freigesetzte Ölsäure läßt sich als unlösliches Ca-Salz ausfällen (SIERRA, 1957). Die CT-Agarplatten wurden, wie unter 2.2. beschrieben, hergestellt und zur Analyse von Lipaseproduktion mit Einzelkolonien oder Bakterienimpfstrichen versehen. Abb. 1 zeigt ein typisches Ergebnis. Kolonien von Lipaseproduzenten konnten im Durchlicht durch die dunkel erscheinenden Ausfällungen (Abb. 1(a)) in denen von ihnen eingeschlossenen und sie umgebenden Öltröpfchen erkannt werden; das präzipitierte Ca-Oleat erschien im Auflicht weiß. In Kolonien mit fehlender Lipaseaktivität blieben die Öltröpfchen durchsichtig (Abb. 1 (b)). Das Testsystem ließ sich für qualitative Untersuchungen einsetzen und ergab eindeutige Beurteilungen bei unterschiedlichen Bakterienarten (Beispiele für Gram-negative Arten: *Pseudomonaden*, *E. coli*, *Alcaligenes eutrophus* H16, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* etc.). Eine Quantifizierung der abgegebenen Lipasemenge oder eine eindeutige Lokalisierung des Enzyms (extrazellulär oder zellgebunden) war nicht möglich. Das CT-Selektionsmedium wurde im Verlauf der Arbeit sowohl zur Mutantensuche als auch zum Nachweis Lipaseproduzierender Klone eingesetzt.

3.2. Isolierung von Lip⁻-Mutanten

Es sollten Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa* PAO gewonnen werden, für die keine Lipaseaktivität im extrazellulären Milieu mehr nachzuweisen war. In einem zweiten Schritt sollte der Gendefekt dieser phänotypisch gleichen Lip⁻-Mutanten charakterisiert werden, wobei nur die Mutanten des Lipase-Strukturgens (*lip*) einer weiteren Untersuchung zugeführt werden sollten.

Mutagenisierungsansätze unter Verwendung des Transposons Tn5, lokalisiert auf dem Selbstmordplasmid pSUP2021, das von SIMON et al. (1983) zur Mutagenisierung von *Rhizobium meliloti* eingesetzt wurde, waren nicht erfolgreich. Der hier betrachtete *Pseudomonas*-Stamm zeigte eine zu hohe Resistenz (> 1mg/ml) gegenüber Kanamycin, dem Antibiotikum, dessen Resistenz durch Tn5 vermittelt wird, so daß erhaltene Tn5-Mutanten nicht selektiert werden konnten. Späterhin veröffentlichte Mutagenisierungsverfahren unter Verwen-

dung beispielsweise des Tetracyclin-Resistenz Transposons Tn10 (HOLLOWAY, 1986) konnten nicht mehr berücksichtigt werden. Es wurde deshalb eine chemische Mutagenese mit Nitrosoguanidin (NG) durchgeführt.

Nach der Methode wie unter 2.7. dargestellt, wurde zunächst der Stamm *P. aeruginosa* PAO1 mit der Zielsetzung mutagenisiert, temperatursensitive Mutanten des Lipase-Strukturgens zu selektieren. 1% der 8000 betrachteten Mutantenkolonien waren nach Anzucht bei 37°C phänotypisch Lip⁻; 60 von ihnen wurden differentiell bei 30°C und 37°C im pNPP-Test (2.12.1.) auf extrazelluläre Lipase-Produktion überprüft. Dabei reduzierte sich die Anzahl derer, die bei 30°C Wildtyp- und bei 37°C keine Lipaseaktivität zeigten, auf eins. (Anmerkung: Auch für den Wildtyp-Stamm *P. aeruginosa* PAO1 wurde eine um den Faktor 5-10 geringere Lipaseaktivität nach Anzucht bei 37°C gefunden.) Für diese Mutante wurde das Hitzeinaktivierungsverhalten des Lipase-Enzyms im Vergleich zum Wildtyp-Enzym verfolgt. Dazu wurden mehrere Proben der NB-Kulturflüssigkeit nach Abtrennung der 16 h bei 30°C darin gewachsenen Zellen je 30 min bei 0°C-90°C inkubiert und dann die Lipase-Restaktivität im pNPP-Test (2.12.1) bestimmt. Zwischen der temperaturabhängigen Abnahme der Aktivität des Mutanten- und Wildtyp-Enzyms wurde kein signifikanter Unterschied gefunden: 50 % Aktivitätseinbuße bei 50°C bzw. 47°C. Die gewünschte Hitzesensitivität des Lipase-Enzyms konnte nicht gezeigt werden und die erhaltene Mutante wurde nicht weiter untersucht. Da das Ergebnis dieses Versuches eine Selektion temperatursensitiver Mutanten als nicht sehr aussichtsreich erscheinen ließ, wurde er nicht wiederholt.

Stattdessen sollten Mutanten, denen eine extrazelluläre Lipaseaktivität völlig fehlte, isoliert werden. Dazu wurden nach gleicher Methode (2.7.) zwei weitere Mutagenisierungsansätze (Tab.1) bearbeitet, um sicherzugehen, daß unabhängige Mutanten selektiert werden konnten. Als Mutantenelternstamm wurde hierfür *P. aeruginosa* PAO2302 (abgeleitet vom Wildtyp-Stamm *P. aeruginosa* PAO1) ausgewählt. Er trug bereits genetisch lokalisierte Marken, die über das Genom (von ca. 30 - 65 min) verteilt waren, was in den folgenden kreuzungsgenetischen Versuchen ausgenutzt werden sollte. Eine Überprüfung seiner Lipaseaktivität ergab Wildtypaktivität (vergl. 3.3.1.).

Mutagenese- ansatz	untersuchte Kolonien	Lip ⁻ -Kolonien	
		Anzahl	Anteil in %
1	8200	37	0,5
2	8800	23	0,3

Selektionsmedium: CT-Agar (2.2.)

Tab. 1 Anzahl der selektierten Lip⁻-Mutanten nach Nitrosoguanidin Mutagenese von *P. aeruginosa* PAO2302

Die 60 Lip⁻-Mutanten der 17000 untersuchten Kolonien wurden über einen Einzelkolonieausstrich auf NB-Vollmedium gereinigt und dann in den charakterisierenden Untersuchungen (3.3.) eingesetzt. Aus Mutagenisierungsansatz 1 werden im weiteren die Mutanten 28-1 und 29-1, aus Ansatz 2 die Mutanten 6-1 und 17-1 exemplarisch betrachtet, wobei ihr Phänotyp allgemein mit Lip⁻ bezeichnet wird. Außerdem soll hier die Benennung des Gendefekts (*lip*) für die Mutanten 29-1 und 6-1 eingeführt werden, obwohl erst späterhin ermittelt wurde, daß es sich hierbei um Strukturgenmutanten handelte.

3.3. Mikrobiologische und biochemische Charakterisierung der Lip⁻-Mutanten

Die 60 mit Lip⁻-Phänotyp isolierten Mutanten mußten bezüglich ihres Gendefektes charakterisiert werden. Das Ziel der Experimente lag im Auffinden von Mutanten, die im Strukturgen der extrazellulären Lipase (*lip*) defekt waren. Dazu mußten sie eindeutig von solchen Mutanten, die bei gleichem Phänotyp Defekte in Genen des Transportsystems oder der Regulation besaßen, abgegrenzt werden. Wesentliche Grundlage für diese Untersuchungen stellte das bekannte Phänomen der Pleiotropie von Transport- und Regulationsmutanten (WRETLIND et al., 1977; WRETLIND & PAVLOVSKIS, 1984) dar, die sich im allgemeinen durch ein differentielles Erscheinungsbild der von ihnen ins Medium abgegebenen Produkte auszeichnen. Ein direkter Nachweis einer Strukturgenmutation war nicht zu führen, so daß die

Summe der erhaltenen Einzelergebnisse die Beschreibung der gewünschten Mutante ausmachte.

3.3.1. Bestimmung der extrazellulären Lipaseaktivität

Qualitative Untersuchungen zur Lipaseproduktion wurden auf CT-Agarplatten (2.2.) durchgeführt. Die Ergebnisse, die nach Bebrütung bei 30°C und 37°C erhalten wurden, bestätigten, daß der Wildtyp-Stamm *P. aeruginosa* PAO1 und der Mutantenelternstamm PAO2302 unter gegebenen Bedingungen gute Lipaseproduzenten waren, während für die Mutanten (29-1; 6-1; 17-1; 28-1) keine Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Dieses Ergebnis war in Flüssigmedium unter verschiedenen Anzuchtbedingungen zu reproduzieren und außerdem zu quantifizieren. Die *P. aeruginosa* PAO Stämme wurden in NB-Vollmedium 16 h bei 30°C oder 37°C in Analogie zu den Anzuchtbedingungen von JÄGER, (pers. Mitteilung) oder aber in M9-Minimalmedium 23 h bei 30°C (WINGENDER, pers. Mitteilung) bebrütet. Nach Abtrennen der Zellen durch Zentrifugation wurde in der geklärten Kulturlösung die Lipase-

Stamm	Anzuchtbedingungen		
	NB (16 h)		M9 (23 h)
	30° C	37° C	30° C
PAO1	301	34	77
PAO2302	232	24	90
29-1	1	1	2,8
6-1	4	1,5	2,8
28-1	2,6	0,7	6,2
17-1	1,2	0,7	5,0

gemessen im pNPP-Test (2.12.1.)

alle Angaben in $\text{EU}_{\text{pNPP}} \cdot \text{O.D.}^{-1}$

Tab. 2 Extrazelluläre Lipaseaktivität von *lip*⁺- und *lip*⁻-Stämmen von *P. aeruginosa* PAO, gemessen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen

aktivität mit Hilfe des schnellen, aber nicht Lipase-spezifischen pNPP-Tests (2.12.1.) bestimmt.

Die in Tab. 2 zusammengefaßten Ergebnisse verdeutlichen, daß unter allen Anzuchtbedingungen die betrachteten Lip⁻-Mutanten extrazellulär signifikant weniger pNPP-Spaltungsaktivität bildeten als die beiden lip⁺-Stämme. Worauf die gemessene Restaktivität der Mutanten zurückzuführen war, ob es sich um ein Meßartefakt, um verminderte Lipaseaktivität einer "leaky"-Mutante oder um Esteraseaktivität von nicht quantitativ abgetrennten bzw. lysierten Zellen handelte, mußte noch untersucht werden (s. u.).

Die Differenzen der absoluten pNPP-Spaltungsaktivitäten der lip⁺-Stämme bei verschiedenen Anzuchtbedingungen beruhten auf den unterschiedlichen Wuchsphasen, in denen sich die Zellen befanden, als die Aktivität der erst in der spät-exponentiellen Wuchsphase auftretenden Lipase gemessen wurde. Daß die extrazelluläre Restaktivität der Lip⁻-Mutanten nicht in gleichem Maße von den Anzuchten abhängig war, deutete auf ein von der Lipaseproduktion unabhängiges Phänomen hin; die zellgebundene Esterase wird bei *P. aeruginosa* PAO1 beispielsweise konstitutiv (OHKAWA et al., 1979) gebildet.

Um nun zwischen Lipase- und Esteraseaktivität eindeutig unterscheiden zu können, wurden zwei Testansätze ausgewählt: ein sehr empfindlicher und spezifischer, biolumineszenter Lipasetest (2.12.2.) und ein spezifischer Esterasetest (2.12.3.).

Die zu untersuchenden Zellen wurden 16 h bei 30°C in NB-Vollmedium angezüchtet und die extrazellulären Enzymaktivitäten dann im zellfreien Kulturüberstand (Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt) gemessen. Zur Bestimmung der membranständigen Enzymaktivitäten wurden die sedimentierten Zellen im gleichen Volumen Tris-HCl-Puffer pH 8,5 (2.3.) aufgenommen. Die Messung erfolgte direkt in dieser Zellsuspension, so daß die erhaltenen Werte um die durch die Bakterien hervorgerufene Trübung korrigiert werden mußten. Zur Vergleichbarkeit aller Ergebnisse wurde außerdem auf O.D.₅₈₀ = 1 normiert.

Stamm	(1) extrazellulär			(2) membranständig	
	Lipase	Lipase/ Esterase	Esterase	Lipase/ Esterase	Esterase
	(a)	(b)	(c)	(b)	(c)
PAO1	35,3	104	0,76	21,0	4,0
PAO2302	24,0	145	0,95	47,6	7,0
29-1	0,001	2,6	0,77	8,7	4,7
6-1	0,042	3,2	0,79	9,1	4,4

Anzuchtbedingungen: 16 h, 30°C, NB-Vollmedium

Testsysteme: (a) biolumineszenter Lipasetest (2.12.2.), in EU_{pNPP}

(b) photometrischer p NPP-Test (2.12.1.), in EU_{lum}

(c) photom. Esterasetest (2.12.3.), in EU_{Est}

alle Angaben bezogen auf O.D.₅₅₀ = 1

Tab. 3 Lipase- und Esteraseaktivität von *P. aeruginosa* PAO1 und PAO2302 sowie der beiden *lip*-Mutanten 29-1 und 6-1

Die Tab. 3 gibt Aufschluß über die Menge und Lokalisierung vorhandener Lipase- und Esteraseaktivität. Die Berücksichtigung der Verteilung beider Enzyme war wichtig, da die Lipase als ein extrazelluläres Enzym (WRETLIND et al., 1973), die Esterase aber als membranständig beschrieben wird (OHKAWA et al., 1979). Betrachtet man das extrazelluläre Milieu (Tab. 3 (1)), so wurde im gemischten Lipase-/Esterasetest (Tab. 3 (1b)) für die *lip*-Mutanten 29-1 und 6-1 pNPP-Spaltungsaktivität gemessen, die allerdings nur ca. 2 % - bezogen auf die *lip*⁺-Wildtypstämme - betrug. Diese Aktivität läßt sich einer Esterase zuordnen, wenn man die Ergebnisse der spezifischen Lipase- und Esterasetests in Beziehung setzt. Es konnte für die Mutanten 29-1 und 6-1 extrazellulär keine Lipaseaktivität nachgewiesen werden (Tab. 3 (1a)), wohl aber Esteraseaktivität (Tab. 3 (1c)), die mit den Werten für die *lip*⁺-Stämme übereinstimmte. Vergleichsweise wurden dazu die membrangebundenen Aktivitäten (Tab. 3 (2)) bestimmt. Die gemischte Lipase-/Esteraseaktivität (Tab. 3 (2b)) der Wildtypstämme war dort deutlich niedriger als im Überstand, die im selben Testsystem zellgebunden gemessene Restaktivität der *lip*-Mutanten war aber relativ mit 26 %

(Bezug zu den *lip*⁺-Stämmen) wesentlich höher. Die separat dazu bestimmte Esteraseaktivität lag deutlich höher als die Aktivitätswerte im Überstand und war sowohl für Wildtyp als auch *lip*-Mutanten gleich hoch. Der spezifische Lipasetest konnte mit ganzen Zellen nicht durchgeführt werden.

Das selektive Vorhandensein zellgebundener Esterase konnte auch auf Indikator-Agarplatten (3.3.3.) und in Wuchsversuchen demonstriert werden. PAO1 und PAO2302 konnten in M9-Minimal-Flüssigmedium und auch auf M9-Agarplatten sowohl mit Olivenöl (nur durch Lipasen hydrolysierbar) als auch Tween 80 (Substrat für Lipasen und Esterasen) als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Die *lip*-Mutanten konnten nur durch Tween 80 zum Wachstum gebracht werden. Die Ergebnisse beider Versuchsreihen zeigten somit, daß die im unspezifischen pNPP-Test gemessene Restaktivität der *lip*-Mutanten auf eine unmodifizierte, zellgebundene Esterase zurückzuführen war, die auch im Zellüberstand bestimmbar war, da nicht alle Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt werden konnten. Die betrachteten Mutanten wiesen weder eine extrazelluläre noch eine zellgebundene Lipase auf. Auch intrazellulär - nach Disintegration der Zellen durch Ultraschall - wurde kein pNPP-Aktivitätsunterschied (Ergebnis nicht dargestellt) im Vergleich zum *lip*⁺-Wildtyp bestimmt. Das Fehlen der Lipase dieser Mutanten im extrazellulären Milieu geht also nicht auf eine Verschiebung der Lokalisierung des Enzyms wie bei Transportmutanten (WRETLIND & PAVLOVSKIS, 1984) zurück. Außerdem wurde gezeigt, daß die Mutanten keinen pleiotropen Effekt bezüglich der zellgebundenen Esterase zeigten.

3.3.2. Einfluß von Triolein, exogenem Alginat und Triton X-100 auf die extrazelluläre Lipaseaktivität

Es sollte überprüft werden, ob spezifisch und unspezifisch wirkende Substanzen die Lipasenaktivität der *Lip*⁻-Mutanten beeinflussen können. Dies wurde in drei unabhängigen Versuchsansätzen überprüft und in Bezug zur Wirkung auf die *lip*⁺-Stämme von *P. aeruginosa* PAO bewertet. Die theoretischen Grundlagen der Experimente waren völlig unterschiedlich und umfaßten sowohl Fragen zu Ablösemechanismen von möglicherweise in der Membran eingeschlossenem Enzym, als

auch zur Regulation der Enzymproduktion. Dabei ist die Regulation der Lipaseproduktion von *P. aeruginosa* PAO noch völlig unbekannt, während für die Lipase von *P. fluoreszens* kürzlich beispielsweise eine Stimulation durch $5,75 \mu\text{M Fe}^{+++}$ (MCKELLAR et al., 1987) bzw. durch Olivenöl im Anzuchtmedium (SUZUKI et al., 1988) beschrieben wurde. Für die *P. aeruginosa*-Lipase scheinen beide Mechanismen nicht zutreffend zu sein (JÄGER und WINGENDER, pers. Mitteilungen), sowie folgende Ergebnisse.

Zur Überprüfung des Einflusses von Triolein auf die extrazelluläre Lipaseaktivität wurden Bakterien in Gegenwart von 1 % Olivenöl bei 30°C in NB-Vollmedium angezüchtet und mit Kontrollansätzen ohne Triglyceridzugabe verglichen. Am Beispiel der beiden Stämme *P. aeruginosa* PAO2302 (*lip*⁺) und 6-1 (*lip*) konnte gezeigt werden, daß in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen (über 48 h reproduzierbar) kein signifikanter Unterschied in der extrazellulären und membranständigen Lipaseaktivität gefunden wurde:

PAO2302:	ohne Triolein	60	$\text{EU}_{\text{pNPP}} \cdot \text{O.D.}_{580}^{-1}$
	mit Triolein	75	$\text{EU}_{\text{pNPP}} \cdot \text{O.D.}_{580}^{-1}$
6-1	: ohne Triolein	0	$\text{EU}_{\text{pNPP}} \cdot \text{O.D.}_{580}^{-1}$
	mit Triolein	3	$\text{EU}_{\text{pNPP}} \cdot \text{O.D.}_{580}^{-1}$
extrazelluläre Lipaseaktivität nach 18 h Inkubation, gemessen im pNPP-Test (2.12.1.).			

Ein Regulationseffekt durch Triolein (Olivenöl) konnte demnach für die extrazelluläre Lipaseproduktion von *P. aeruginosa* PAO nicht gezeigt werden, so daß diese Substanz auch - wie gefunden - keinen Einfluß auf die *lip*-Mutanten nahm.

Der zweite Versuchsansatz zur Beeinflussung der Lipaseaktivität basierte auf dem Befund von WINGENDER & WINKLER (1984), daß durch das Polysaccharid Alginat die extrazelluläre Lipaseaktivität gesteigert werden kann. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde bereits 1979 von WINKLER & STUCKMANN in der "detachment-Hypothese" diskutiert. In M9-Minimalmedium wurden 0,2 % (w/v) Alginat (gereinigt) gelöst und die Bakterien darin 23 h bei 30°C angezüchtet. Vergleichsansätze enthielten kein Polysaccharid. Wie in Tab. 4 zusammengefaßt, konnte der Alginat-Stimulationseffekt bezüglich der extrazellulären Lipaseaktivität für die *lip*⁺-Zellen reproduziert werden; es wurde 7,6 mal mehr extrazelluläre Lipaseaktivität bei

Anwesenheit von Alginat im Anzuchtmedium gemessen. Bei den Lip⁻-Mutanten zeigte sich kein Effekt, da unabhängig von Alginat in der Kultur gleichbleibend geringe Enzymaktivitäten bestimmt wurden. Es wurde demnach keine potentiell membranständige, aktive Lipase freigesetzt, die in vorangegangenen Tests (3.3.1.) nicht hat nachgewiesen werden können, weil das Enzym inaktiv oder unzugänglich in der Membran vorlag.

Stamm	Lipaseaktivität		Stimulationsfaktor
	- Alginat	+ Alginat	
PAO1	n.g.	n.g.	--
PAO2302	59	447	7,6
29-1	1,7	1,2	0
6-1	2,2	1,0	0
28-1	5,4	3,5	0
17-1	2,4	1,0	0

Anzuchtbedingungen: 23 h; 30°C; M9-Minimalmedium
ohne/mit 0,2 % Alginat

Aktivitätsbestimmung: im pNPP-Test (2.12.1.) in
EU_{pNPP} · O.D.₅₈₀⁻¹

n.g.: nicht getestet

Tab. 4 Einfluß von exogenem Alginat auf die extrazelluläre Lipase von lip⁺- und Lip⁻-Stämmen von *P. aeruginosa* PAO

Da der Mechanismus des Alginateffekts noch nicht vollständig verstanden ist, wurden in einem weiteren Versuch Proteine durch das Detergenz Triton X-100 unspezifisch aus der Zellmembran herausgelöst. Ein solches Proteingemisch enthält bei früh-stationären *P. aeruginosa*-Zellen auch Lipase (STÜER, 1985). Der Test wurde, wie unter 2.9.2. beschrieben, mit Zellen einer M9-Minimalmediumkultur durchgeführt. 0,02 % (v/v) Triton X-100 wurden zur Solubilisierung der Proteine eingesetzt. Von den Mutanten 29-1, 6-1, 28-1 und 17-1 (Tab. 5) wurde lediglich eine geringe Menge (ca. 3 EU_{pNPP} · O.D.₅₈₀⁻¹) pNPP-Spaltungsaktivität abgelöst, die die norma-

lerweise membranständige Esterase (3.3.1.) repräsentierte. Vom Mutantenelternstamm PAO2302 dagegen konnte zusätzlich die zum Zeitpunkt der Zellernte gerade im Durchtritt befindliche Lipase abgelöst werden, was durch eine vergleichsweise deutliche Steigerung der pNPP-Aktivität nach TX-Behandlung angezeigt wurde - der Ablösefaktor lag bei 9,5 (Tab. 5). Würden transportdefekte Mutanten (eigentlich extrazelluläre Produkte bleiben membranständig) in diesen Vergleich mit einbezogen, sollte von ihnen eine noch um ein Vielfaches höhere Lipaseaktivität abzulösen sein, die der gesamten von der Zelle produzierten Enzymmenge entspräche.

Beide Versuchstypen zum Ablösen potentiell membranständiger Lipaseaktivität ergaben für die Mutanten kein positives Ergebnis. Ihr Lip⁻-Phänotyp beruht demnach wohl nicht auf einem Defekt in der Ausschleusung des Enzyms, wobei dieser Prozeß in der Membran gestoppt würde, das betrachtete Enzym sich dort anhäufte und direkt oder indirekt dort nachweisbar wäre.

Stamm	Lipaseaktivität		Ablösefaktor
	ohne ¹⁾	mit ²⁾	
	Triton X-100		
PAO1	n.g.	n.g.	--
PAO2302	1,3	12,3	9,5
29-1	1,2	2,4	2
6-1	1,4	3,3	2,4
28-1	1,6	3,4	2,2
17-1	1,4	3,5	2,5

Anzuchtbedingungen: 6 h; 30°C; M9-Minimalmedium

1) Detergenzbehandlung: 45 min; 30°C; 0,02 % Triton X-100

2) Kontrolle: 45 min; 30°C; ohne Triton X-100

Aktivitätsbestimmung: im pNPP-Test (2.12.1.) in

$EU_{pNPP} \cdot O.D.580^{-1}$

n.g.: nicht getestet

Tab. 5 Durch Triton X-100 abgelöste Lipaseaktivität von lip⁻- und Lip⁻-Stämmen von *P. aeruginosa* PAO

3.3.3. Allgemeine Bildung von Exoprodukten

Wie aus Publikationen von WRETTLIND et al. (1977) und WRETTLIND & PAVLOVSKIS (1984) bekannt ist, führen Veränderungen im Transportsystem und/oder der Regulation von Exoprodukten zu pleiotropen Mutanten; d. h. eine Mutation bedingt den Ausfall, die Aktivitätsverminderung oder Verschiebung der Lokalisierung mehrerer Exoprodukte. Es war also von besonderer Wichtigkeit, die Lip⁻-Mutanten hinsichtlich pleiotroper Effekte zu überprüfen, um die Strukturmutanten (*lip*) weiter eingrenzen zu können. Als einfaches und schnelles Verfahren boten sich dazu Plattentests an. Die Durchführung und Kriterien zur Auswertung der Versuche wurden unter 2.8. beschrieben.

Nachweis	Wildtyp	Elternst.	Lip ⁻ -Mutanten			
	PAO1	PAO2302	29-1	6-1	28-1	17-1
Hydrolyse von:						
Triolein	+++	+++	-	-	-	-
Tween 80	+++	+++	-/+	-/+	-/+	-
Gelatine	+++	+++	+++	+++	++	+
Elastin	+++	+++	+++	+++	+	-
Protein (allg.)	+++	+++	+++	+++	+	+
Lecithin	+++	+++	+++	+++	-	-
Bildung von:						
Pyocyanin	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Fluorescein	+++	+++	+++	+++	++	+++

gestufte Aktivitätsbeschreibung:

+++ : Wildtypaktivität bis + : schwach positiv

-/+ : fast keine Aktivität (erst nach verlängerter Bebrütung sichtbar)

- : keine Aktivität

Tab. 6 Bildung verschiedener extrazellulärer Produkte von *lip*⁺- und Lip⁻-Stämmen von *P. aeruginosa* PAO auf speziellen Indikatoragarplatten (2.2. und 2.8.)

Die in Tab. 6 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Mutanten 29-1 und 6-1 bezüglich der Bildung extrazellulärer Enzyme und Produkte nicht pleiotrop waren. Sie unterschieden sich nur in der fehlenden Lipaseaktivität (keine Hydrolyse von Triolein) vom Wildtyp PAO1 und Mutantenelternstamm PAO2302. Die verminderte Hydrolyse von Tween 80 beruhte auf dem selektiven Wegfall der Lipase, die dieses Substrat genauso spalten konnte wie die noch vorhandene, zellgebundene Esterase, deren Aktivität auf diesem Medium nun separat nachzuweisen war (vergl. 3.3.1.). Dieses Ergebnis - zusammen mit den Befunden der vorher beschriebenen charakterisierenden Untersuchungen - führte zu der Annahme, daß es sich hierbei um Mutanten des Strukturgens der Lipase handelte. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, ob nicht alternativ eine Veränderung in der Regulation der Lipase vorlag, wenn diese selektiv positiv reguliert würde (darüber existieren noch keine Erkenntnisse).

Anders fiel die Beurteilung der Mutanten 28-1 und 17-1 aus, die bezüglich der Bildung extrazellulärer Produkte ein differenziertes Bild zeigten. Neben einer fehlenden Lipaseproduktion schienen alle anderen Exoprodukte - bis auf das Pyocyanin - vermindert vorzuliegen oder fehlten ganz. Dieses Verhalten auf Indikatoragarplatten war mit denen von WRETLIND et al. (1984) beschriebenen Klasse I - Mutanten (*xcp*) vergleichbar, die als exportdefekt beschrieben wurden. Eine weitere Charakterisierung dieser Mutanten wurde nicht vorgenommen.

Zusätzlich wurden einige weitere Stoffwechselleistungen der Mutanten 29-1 und 6-1 mit denen des *P. aeruginosa* Wildtyps PAO1 und des Mutantenelternstammes PAO2302 verglichen. Alle der 21 mit Hilfe des API 20 NE-Systems (2.2) überprüften physiologischen Fähigkeiten stimmten für alle 4 Stämme überein. Dabei wurden so unterschiedliche Dinge wie Nitratreduktion, Fermentation von Glukose oder die Verwertung diverser Kohlenstoffquellen, von denen Glukose, Mannit, N-Acetylglucosamin, Glukonat, Caprat, Adipat, Malat und Citrat assimiliert werden konnten, untersucht. Ein weiterer Hinweis darauf, daß diese Mutanten sich nur durch die Mutation (*lip⁺* -> *lip*) vom Elternstamm PAO2302 unterschieden.

3.3.4. Betrachtungen der äußeren Membran

Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien wirkt als strukturelle Barriere, die nur durch geregelte Exportsysteme, beispielsweise in Form der "Bayer-junctions" (LORY et al., 1983), überwunden werden kann. Ist ihre Struktur verändert, so kann dies zu exportdefekten Mutanten führen. Obwohl die Ergebnisse der Versuche 3.3.1.-3.3.3. für die Mutanten 29-1 und 6-1 nicht auf einen solchen Defekt hindeuten, sollten die folgenden Untersuchungen der äußeren Membran weitere Ergebnisse zur Unterstützung dieser Aussage liefern. Es wurden zwei völlig verschiedene Methoden ausgewählt. Erstens wurde in einem Phagen-Lysistest der Einfluß von *P. aeruginosa*-Phagen auf die Stämme PAO1, PAO2302 und auf die Mutanten 29-1 und 6-1 ermittelt. Dadurch sollte in einem physiologischen Test nachgewiesen werden, ob bestimmte Oberflächenstrukturen, die als spezifische Phagen-Rezeptoren dienen, bei den Mutanten verändert waren. Das zweite Nachwiesverfahren basierte auf der biochemischen Darstellung der Membrankomponenten Proteine und LPS.

Der Phagen-Lysistest wurde mit 10 verschiedenen *P. aeruginosa*-Phagen durchgeführt (2.10.), deren mögliche Rezeptoren in der äußeren Membran teilweise bekannt waren (NICAS & HANCOCK, 1980). Der Wildtypstamm PAO1 ließ sich von allen der ausgewählten Phagen gut lysieren. Die *lip*-Mutanten 29-1 und 6-1 und ihr zugehöriger Elternstamm PAO2302, von dem sie mutativ abgeleitet wurden, ließen sich von dem proteinspezifischen Phagen F 116 L, der auch in Transduktionsexperimenten eingesetzt wird, nicht und von den ebenfalls proteinspezifischen Phagen 21 und 68 nur sehr begrenzt lysieren (d. h. nur unverdünnte Phagenlysate mit 10^{10} PFU/ml wirkten im Tropftest lysierend). In einem zusätzlichen Adsorptionsversuch (an Bakterien gebundene Phagen wurden differentiell abzentrifugiert) konnte für F 116 L beispielsweise gezeigt werden, daß die Phagenpartikel sich nicht spezifisch an die Zellen von PAO2302, 29-1 oder 6-1 anhefteten. Daraus war abzulesen, daß bereits der *P. aeruginosa*-Stamm PAO2302 in Komponenten der äußeren Membran, verglichen mit dem Wildtyp PAO1, verändert war. Diese Unterschiede hatten aber keinen Einfluß auf die extrazelluläre Lipaseaktivität, da PAO1 und PAO2302 bezüglich dieses Enzyms gleiche Aktivitäten aufwiesen (3.3.1.). Die *lip*-Mutanten zeigten keine weiteren Differenzen in ihrem Lysisverhalten, so daß Änderungen der Phagenrezeptoren

toren, was Aufschluß über Veränderungen in der äußeren Membran gibt, nicht Grundlage des *lip*-Phänotyps sein konnten.

Phagen	Phagen- Rezeptor	Wildtyp PAO1	Elternst. PAO2302	<i>lip</i> -Mutanten	
				29-1	6-1
F 8	LPS	+	+	+	+
44		+	+	+	+
E 79		+	+	+	+
109		+	+	+	+
2	LPS o.	+	+	+	+
B5A	Protein	+	+	+	+
7		+	+	+	+
21		+	+/-	+/-	+/-
68	Protein	+	+/-	+/-	+/-
F 116 L		+	-	-	-

+ : gute Lysierbarkeit

+/- : sehr eingeschränkte Lyse

- : keine Lyse

Tab. 7 Lysierbarkeit (2.10.) verschiedener *lip*⁺- und *lip*-Stämme von *P. aeruginosa* PAO durch Phagen mit unterschiedlicher Rezeptorspezifität

Durch biochemische Präparation der Einzelkomponenten der äußeren Membran (2.11.) und ihrer Darstellung nach Auftrennung in Polyacrylamidgelen (2.11.1. und 2.11.2.), konnte ebenfalls gezeigt werden, daß sich Struktur und Zusammensetzung von Elternstamm und Mutanten makroskopisch nicht verändert hatte.

Das Bandenmuster der Proteindarstellung (Abb. 2b) von PAO1 (Spur 1) zeigte deutlich die Proteinhauptkomponenten, wie sie in der äußeren Membran einer nicht unter Eisen-Limitierung (NB-Vollmedium) gewachsen *P. aeruginosa*-Kultur auftreten. Sie wurden von HANCOCK & CAREY (1979) in der Reihenfolge ihres abnehmenden Molekulargewichts mit (D₁), D₂, E, F, G, H₁, H₂ und I bezeichnet. PAO

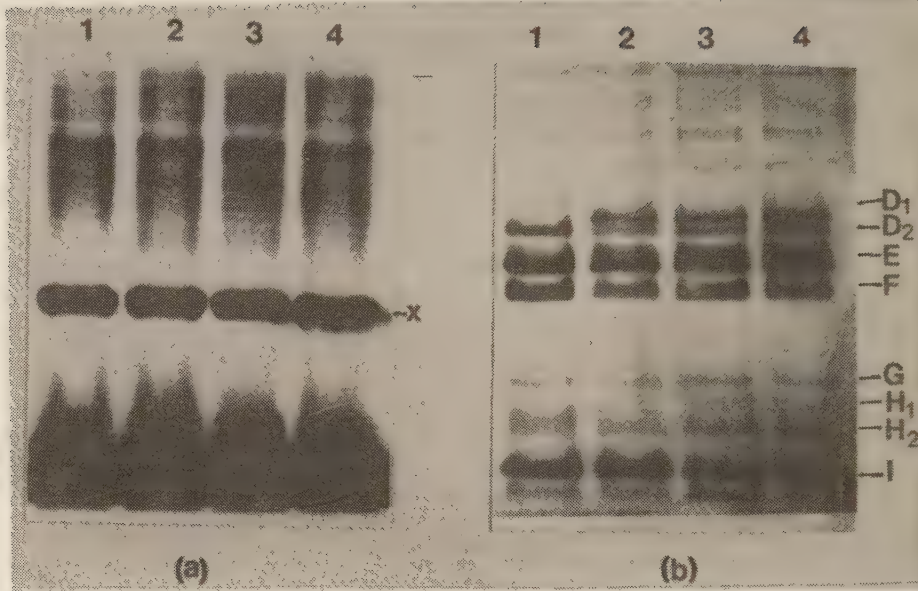


Abb. 2 SDS-PAGE der Komponenten der äußeren Membran von *lip*⁺- und *lip*-Stämmen von *P. aeruginosa* PAO nach Wachstum in NB-Vollmedium

(a) LPS ;Präp.: 2.11.1. - Silberfärbung

(b) Membranproteine ;Präp.: 2.11.2. - Coomassie-Färbung
es befinden sich in Spur 1 : PAO1

Spur 2 : PAO2302

Spur 3 : 29-1

Spur 4 : 6-1

D-I: Bezeichnung von OM-Proteinen (siehe Text)

X: unbekanntes Protein (siehe Text)

2302 und die abgeleiteten *lip*-Mutanten wiesen über der D₂-Bande nach Anzucht in NB-Vollmedium noch eine zusätzliche Proteinbande auf, die beim Wildtyp PAO1 vergleichsweise nur in Anwesenheit von Glukose (Anzucht in M9-Glukose Minimalmedium, Ergebnisse nicht im Bild dargestellt) auftrat. Es handelte sich dabei um das Glukose

induzierbare Protein D₁ (HANCOCK & CAREY, 1980), welches sowohl in PAO2302 als auch den abgeleiteten *lip*-Mutanten unabhängig vom Induktor konstitutiv synthetisiert wurde und folglich nicht die Begründung für den Lipasedefekt von Mutante 29-1 und 6-1 sein konnte.

Das LPS-Muster, dargestellt in Abb. 2a, war für alle in NB-Vollmedium gezogenen *lip*⁻ und *lip*-P. *aeruginosa*-Stämme gleich. Die deutlich hervortretende Proteinbande (Abb. 2a, X) wurde als Präparationsartefakt verschiedentlich beobachtet. Eine Aussage, um welches vor Proteinase K-Verdauung (vergl. 2.11.1.) geschützte Protein es sich handelte, wurde nicht gemacht. Das erhaltene LPS-Bandierungsmuster (Abb. 2a) wurde erwartet, da PAO1 ein glattes LPS produziert (KROPINSKI et al., 1979).

Die Abbildungen 2a und 2b ließen also weder für die Proteinkomponenten noch für die Zusammensetzung des LPS eine Veränderung erkennen, die zur Lipasen negativität der Mutanten 29-1 und 6-1 hätte beitragen können. Dies Ergebnis unterstützte also erneut die These, daß die Mutanten 29-1 und 6-1 keinen Defekt im Transport der Lipase aufwiesen, denn für entsprechende Transportmutanten konnten FECYCZ & CAMPBELL (1985) beispielsweise ein verändertes Proteinprofil der äußeren Membran nachweisen.

3.4. Lokalisierung des *lip*-Genlocus auf der Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1

In Konjugations- und Transduktionsversuchen sollte für die Lipase-Strukturgenmutanten 29-1 und 6-1 der zugehörige *lip*-Genlocus auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1 bestimmt werden. Die Kartierung erfolgte in drei aufeinander aufbauenden Versuchsreihen, um den Locus schrittweise einzugrenzen.

1. Mit dem Plasmid FP5 wurde eine Grobkartierung vorgenommen: *lip*-Locus früher oder später als 50 min.
2. Die Feinkartierung erfolgte mit dem Plasmid R68.45.
3. Eine noch präzisere Lokalisierung wurde in Transduktionsexperimenten mit dem Phage G101 erzielt.

Da es bis 1987 (O'HOY & KRISHNAPILLAI) für *P. aeruginosa* kein dem *E. coli* vergleichbar effizientes Hfr-Transfersystem gab, wurden Kreuzungsversuche nach der "Fahrplantechnik" nicht durchgeführt.

Die Angaben zur Lokalisation des Lipase-Gens bezogen sich alle auf relative Cotransferraten, wie sie sich aus der gemeinsamen Übertragung mit einer bekannten, bereits kartierten Genmarke ergaben. Die absoluten Positionsangaben in "min" auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1 wurden nach HOLLOWAY & MATSUMOTO (1984) gemacht, die Rekalibrierung des Chromosoms durch O'HOY & KRISHNAPILLAI (1987) wurde in Abb. 5 und in der Diskussion berücksichtigt.

Die Selektion der jeweiligen Transkonjuganten der einzelnen Experimente erfolgte auf den verschiedenen, entsprechend supplementierten Minimalmedien (2.2.).

3.4.1. Grobkartierung mit Plasmid FP5

Da das Plasmid FP5 das *P. aeruginosa* PAO1 Chromosom bei 0 min beginnend gegen den Uhrzeigersinn mobilisiert, werden die ersten Gene bis ca. 30 min mit hoher Frequenz (10^{-3} - 10^{-4} pro Donorzelle), die distalen aber nur sehr selten oder gar nicht übertragen (MATSUMOTO & TAZAKI, 1973; MATSUMOTO et al., 1978). Das Plasmid kann zur groben Auffindung eines Genlocus benutzt werden, detaillierte Untersuchungen im "späten Bereich" des Chromosoms wären damit allerdings nicht möglich.

Der Kreuzungsansatz in Flüssigmedium wurde so gewählt, daß ausreichend Zeit zum potentiellen Transfer des gesamten Chromosoms (3 h) bestand (vergl. 2.14.1.). Es wurde der Cotransfer der *lip*-Genmarke mit wenigen ausgewählten, über das ganze Chromosom verteilten, Genmarken überprüft.

Durch die Eigenschaft des Plasmids FP5, das Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1 linear von einem Ursprung aus zu mobilisieren, konnte die *lip*-Genmarke zu einem hoher Prozentsatz nur zusammen mit einer selektiven Genmarke übertragen werden, die distal zum *lip*-Locus oder in unmittelbarer Nähe davor lokalisiert war. Für die Strukturmutanten (vergl. 3.3.) 29-1 und 6-1 wurde herausgefunden, daß nur bei Selektion auf die *catA1*-Genmarke bei 64 min nahezu alle Transkonjuganten gleichzeitig auch *lip*⁺ waren. Bei *met-9020* (55 min) als selektiver Genmarke betrug der Cotransfer nur ca. 60 %

Donor (FP5 ⁺)	x	Rezipient	selektive Genmarke		Cotransfer von <i>lip</i> (%)
			Name	Position (min)	
29-1		PAO25	<i>argF10</i>	45	0
			<i>leu-10</i>	54	3,2
PAO4020		29-1	<i>met-9020</i>	55	59
			<i>catA1</i>	64	95
6-1		PAO25	<i>argF10</i>	45	0
			<i>leu-10</i>	54	0
PAO4020		6-1	<i>met-9020</i>	55	57
			<i>catA1</i>	64	95
PAO4020		28-1	<i>met-9020</i>	55	99
PAO4020		17-1	<i>met-9020</i>	55	99

Kreuzungen: (2.14.1.), wenigstens zweimal durchgeführt
je Genmarke: 250 Transkonjugante überprüft

Tab. 8 Cotransfer der *lip*-Genmarke der Strukturgenmutanten 29-1 und 6-1, sowie weiterer Mutanten des *Lip*⁻-Phänotyps (28-1 und 17-1) mit bereits lokalisierten, selektiven Genmarken des *P. aeruginosa* PAO1-Chromosoms in FP5 abhängigen Kreuzungsexperimenten

(Tab. 8). Verwendete man Genmarken zur Selektion, die an früherer Position auf dem Chromosom lokalisiert waren (45 min), konnte eine gleichzeitige Übertragung des *lip*-Locus nicht beobachtet werden (Tab. 8). Dies Ergebnis ließ die Aussage zu, daß der gesuchte Genlocus später als 45 min, wahrscheinlich zwischen 55 min und 64 min auf dem Chromosom aufzufinden ist.

Anders fiel die Beurteilung der Kreuzungsexperimente mit den Mutanten 28-1 und 17-1 aus, die wegen ihrer Pleiotropie bezüglich des Auftretens extrazellulärer Produkte (Tab. 7) nicht den Lipase-

Strukturgenmutanten zuzuordnen waren. Durch eine vollständige Übertragung ihres Gendefekts (zum *lip*⁻-Phänotyp) zusammen mit der selektiven Genmarke *met-9020* bei 55 min zeigte sich, daß der Genlocus dieser Mutanten vor 55 min (oder bei 55 min) auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1 lag, und wohl nicht identisch mit demjenigen der Strukturgenmutanten war.

3.4.2. Feinkartierung mit Plasmid R68.45

Die Ergebnisse der Grobkartierung ergaben, daß der *lip*-Genlocus auf der späteren Region (nach 55 min) des Chromosoms von *P. aeruginosa* PAO1 lag. Da die Übertragungskapazität des Plasmids FP5 dort nicht ausreicht, um genaue Ergebnisse zu erhalten, wurde das Plasmid R68.45 eingesetzt. Dieses kann alle Gene mit einer Frequenz von 10^{-3} - 10^{-5} pro Donorzelle mobilisieren (HAAS & HOLLOWAY, 1976), da mehrere Transferstartpunkte über das gesamte Chromosom verteilt sind und die Transferrichtung alternativ ist. Es werden DNA-Abschnitte von ca. 10 min Länge übertragen (HAAS & HOLLOWAY, 1976).

In R68.45 abhängigen Konjugationen wurde der *lip*-Cotransfer mit Genmarken zwischen 14 min und 90 min untersucht, wobei der Schwerpunkt bei Genmarken im Bereich von 55 min bis 64 min (3.4.1.) lag. Die Konjugationen wurden wie unter 2.14.2. beschrieben auf Agarplatten (2.2.) durchgeführt.

Die Tabellen 9a und 9b fassen die Ergebnisse diverser Konjugationsexperimente zusammen. Die Donoren enthielten jeweils das Plasmid R68.45, das vor Versuchsbeginn in speziellen Transferexperimenten (wie 2.14.2.) übertragen wurde, wobei auf die plasmidkodierten Resistenzen selektiert und in einem Vorversuch die Chromosomenmobilisierungsfähigkeit überprüft wurde. Da die zu untersuchenden Mutanten 29-1 und 6-1 nur eine Methioninauxotrophie enthielten, die zur Kontraselektion verwendet werden konnte, dies aber in einigen Versuchsansätzen nicht ausreichend war, wurden die Stämme erneut mutagenisiert (2.7.). Sie erhielten zusätzlich eine Leucin- bzw. Argininauxotrophie und wurden dann mit 29-2/29-4 und 6-2/6-4 benannt. Ihre *lip*-Charakteristik (wie 3.3.) wurde durch diese zweite Mutation nicht verändert.

Donor (R68.45)	x	Rezipient	selektive Genmarke		Anzahl selekt. Kolonien	Cotransfer von <i>lip</i> (%)
			Name	Position (min)		
6-1		PAO325	<i>argB18</i>	14	250	0
			<i>lys-57</i>	20	250	0
6-1		PAO436	<i>ser-3</i>	30	250	0
PAO8	6-2		<i>met-9020</i>	55	234	32
			<i>met-9020/</i>	55/		
			<i>catA1</i>	64	115	100
PAO25	6-1		<i>met-9020</i>	55	297	25
			<i>catA1</i>	64	250	14
6-1	PAO166		<i>leu-10</i>	54	192	2
			<i>pyrF</i>	57	221	57
6-1	PAO388		<i>aro-1</i>	53	247	10
			<i>pyrF69</i>	57	246	95
			<i>pur-70</i>	89	250	0
6-4	PAO4044		<i>dcu-9041</i>	60	189	27
			<i>mtu-9002</i>	70	312	4
			<i>tyu-9030</i>	75	172	1
			<i>dcu-9041/</i>	60/		
			<i>mtu-9002</i>	70	146	47

Tab. 9a Cotransfer der *lip*-Genmarke der Strukturgenmutante 6-1/
6-2/6-4 mit selektiven Genmarken des *P. aeruginosa* PAO1-
Chromosoms in R68.45 abhängigen Kreuzungsexperimenten

Donor (R68.45)	x	Rezipient	selektive Genmarke		Anzahl selekt. Kolonien	Cotransfer von lip (%)
			Name	Position (min)		
PAO8		29-2	<i>met-9020</i>	55	243	24
			<i>met-9020/</i>	55/		
			<i>catA1</i>	64	144	98
PAO25		29-1	<i>met-9020</i>	55	250	19
			<i>catA1</i>	64	200	18
			<i>met-9020/</i>	55/		
			<i>catA1</i>	64	248	93
29-1		PAO388	<i>aro-1</i>	53	249	2
			<i>pyrF69</i>	57	213	91
			<i>pur-70</i>	89	191	0
			<i>aro-1/</i>	53/		
			<i>pyrF69</i>	57	95	92
29-1		PAO166	<i>leu-10</i>	54	241	1
			<i>pyrF</i>	57	95	93
29-4		PAO4044	<i>dcu-9041</i>	60	68	16
			<i>tyu-9030</i>	75	100	0

Tab. 9b Cotransfer der *lip*-Genmarke der Strukturgenmutante 29-1/
29-2/29-4 mit selektiven Genmarken des *P. aeruginosa* PAO1-
Chromosoms in R68.45 abhängigen Kreuzungsexperimenten

Aus den Feinkartierungsexperimenten mit Plasmid R68.45 (Tab. 9a, 9b) wurde sowohl für die Mutante 29 als auch 6 auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1 der zugehörige *lip*-Locus bei ca. 57 min ermittelt. Dies ergab sich aus zwei Befunden: die höchsten Cotransferraten wurden jeweils mit den Genmarken *pyrF69* bzw. *pyrF*, die bei 57 min kartieren, erzielt; bei gleichzeitiger Selektion auf zwei Genmarken, die vor und hinter 57 min lokalisiert waren, wurde die *lip*-Marke zu fast 100 % mitübertragen. Mit zunehmendem Abstand von diesem Locus nahm die Cotransferrate zwischen selektiver Gen-

marke und lip-Marke sukzessive ab, wie dies in Abb. 3 graphisch veranschaulicht wurde.

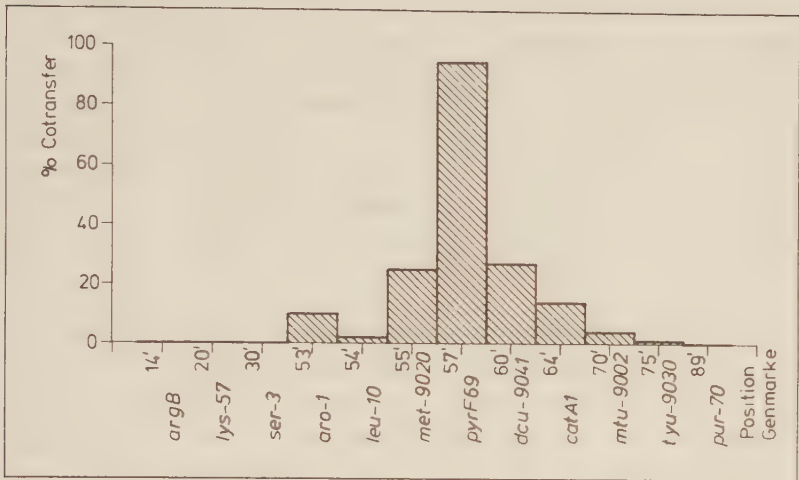


Abb. 3 Graphische Darstellung prozentualer Cotransferraten der lip-Genmarke der Lipase-Strukturgenmutante 6 mit selektiven Genmarken unterschiedlicher Lokalisierung auf dem Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1 (Werte: Tab. 9a)

3.4.3. Transduktion mit dem Phagen G101

In der Literatur werden vorwiegend Transduktionsexperimente mit dem Phagen F 116 L beschrieben (HOLLOWAY et al., 1979). Da dieser Phage aber nicht an die zu untersuchenden Bakterienstämme PAO2302, 29-1 und 6-1 adsorbierte (3.3.4. und Tab. 7), wurde hier auf den weniger verwendeten, ebenfalls generell transduzierenden Phagen G101 ($3,8 \cdot 10^7$ D; MILLER et al., 1974) zurückgegriffen, der entsprechend seiner Größe ca. 1,5 min des Bakterienchromosoms übertragen kann. Die Präparation der zur Transduktion eingesetzten Phagenlysate erfolgte wie unter 2.6.2. und die Transduktion wie unter 2.15. beschrieben.

G101- Donor	x	Rezipient	selektive Genmarke		Cotransfer von <i>lip</i> (%)
			Name	Position (min)	
29-1	PAO4044		<i>dcu-9041</i>	60	0
			<i>mtu-9002</i>	70	0
			<i>tyu-9030</i>	75	0
PAO1	29-1		<i>met-9020</i>	55	0
			<i>catA1</i>	64	0
29-1	PAO166		<i>leu-10</i>	54	0
			<i>pyrF</i>	57	58
6-1	PAO4044		<i>dcu-9041</i>	60	0
			<i>mtu-9002</i>	70	0
			<i>tyu-9030</i>	75	0
PAO1	6-1		<i>met-9020</i>	55	0
			<i>catA1</i>	64	0
6-1	PAO166		<i>leu-10</i>	54	0
			<i>pyrF</i>	57	60

Transduktionen: (2.15.), je zweimal durchgeführt
je Genmarke: 250 selektierte Kolonien überprüft

Tab. 10 Transduktionsexperimente mit dem Phagen G101 zur Feinst-
kartierung des *lip*-Locus der Lipase-Strukturgenmutanten
29-1 und 6-1 auf der Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1

Durch die Transduktionsexperimente mit dem generell transduzierenden Phagen G101 konnte gezeigt werden, daß der betrachtete *lip*-Genlocus nur mit *pyrF*, der Genmarke für die Orotidin-5-phosphat Decarboxylase, cotransduziert wurde. Eine gemeinsame Übertragung mit weiteren Genen der Region wurde nicht nachgewiesen. Demnach konnte die Lokalisierung des Lipase-Gens in unmittelbarer Nachbar-

schaft des *pyrF*-Gens (bei 57 min) auf dem *P. aeruginosa* PAO1 Chromosom als gesichert angesehen werden.

Außerdem konnte der Abstand der beiden Genloci *lip* und *pyrF* berechnet werden. Bei einer Gesamtlänge des *P. aeruginosa* PAO1 Chromosoms von $2,1 \cdot 10^9$ D (PEMBERTON, 1974), die sich nach HOLLOWAY & MATSUMOTO (1984) in 95 min untergliedert, einer Transferkapazität des Phagen G101 von ca. 1,5 min DNA-Länge, sowie einer ermittelten Cotransduktionsrate von 60 %, ergab sich ein Abstand für die beiden Gene von 13 MD (20 kb). Bei Berücksichtigung der Rekalibrierung des *P. aeruginosa* PAO1-Chromosoms (75 min) durch O'HOY & KRISHNAPILLAI (1987) vergrößert sich der Abstand auf 17 MD (25 kb).

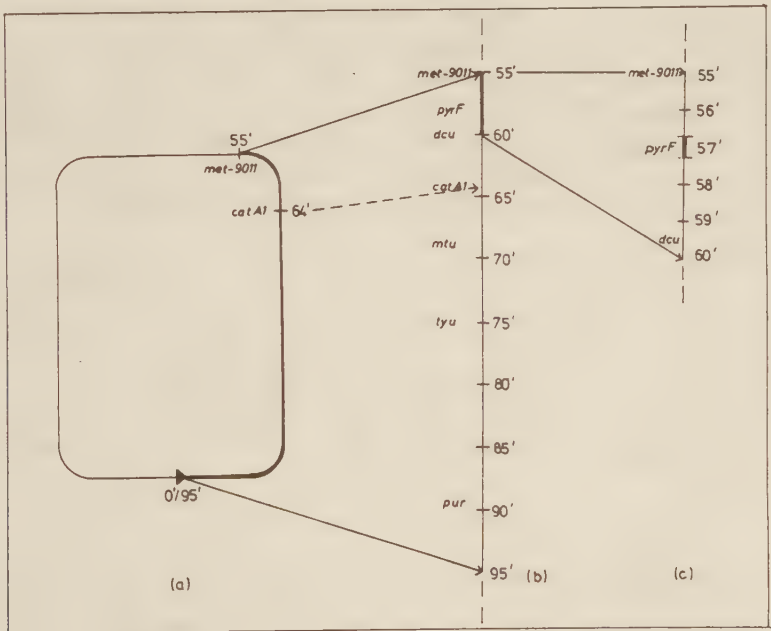


Abb. 4 Schematische Übersichtsdarstellung zur Kartierung des Lipase-Gens auf der Genkarte des Chromosoms von *P. aeruginosa* PAO1 durch schrittweise Eingrenzung des Locus
 (a) Grobkartierung mit Plasmid FP5, (3.4.1.)
 (b) Feinkartierung mit Plasmid R68.45, (3.4.2.)
 (c) Transduktion mit dem Phagen G101, (3.4.3.)

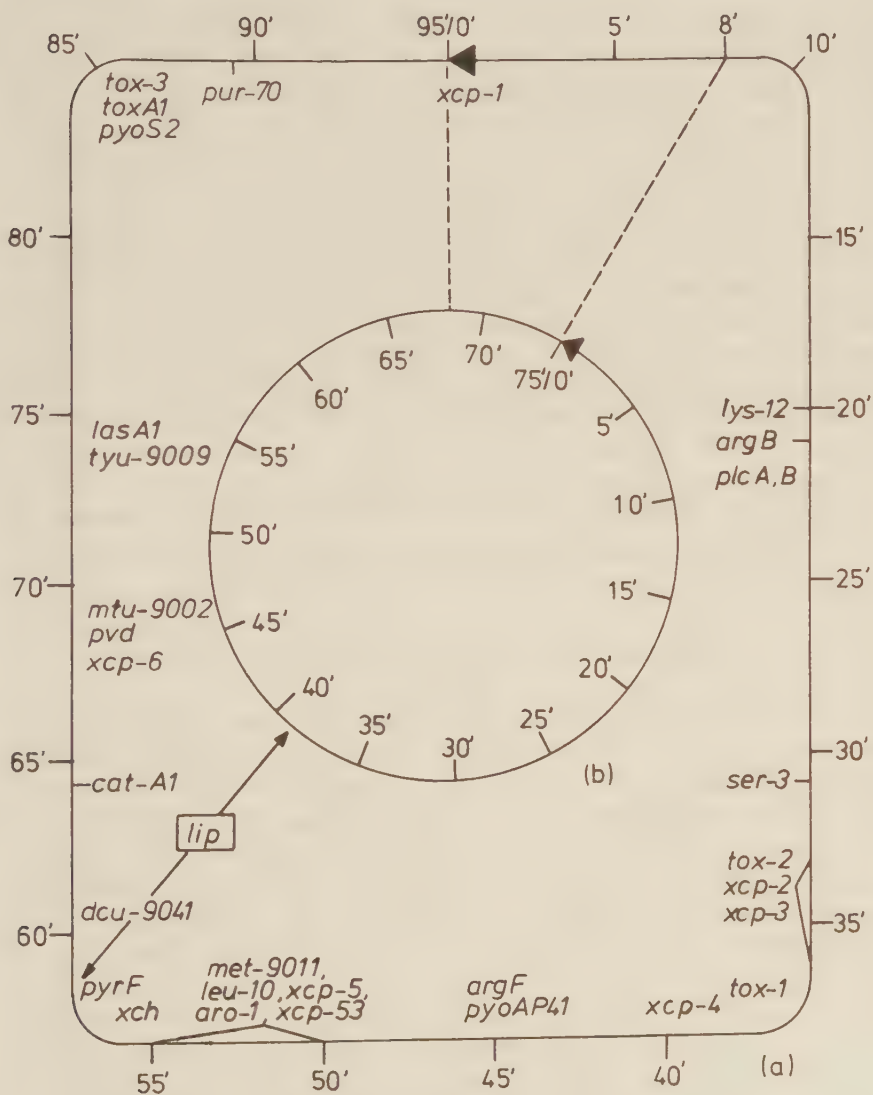
Mit den unter 3.4. dargestellten Experimenten wurde eine eindeutige Lokalisierung des Strukturgens der Lipase (*lip*) in unmittelbarer Nähe des *pyrF*-Genlocus gezeigt. Je nach zu Grunde gelegter Genomkarte bzw. Genomlänge (95 min nach HOLLOWAY & MATSUMOTO, 1984; 75 min nach O'HOY & KRISHNAPILLAI, 1987) kartierte das Gen bei 57 min oder ca. 39 min. Dies unterscheidet die Lipase-Strukturgenmutanten 29-1 und 6-1 deutlich von denen bei ca. 55 min kartierenden (95 min-Genkarte) Transport- und Regulationsmutanten von WRETTLIND & PAVLOVSKIS (1984) und BJÖRKLIND et al. (1985), deren Genmarken *xcp-5* und *xch* mit *met-9011* (= *met-9020*) oder *pyrD* durch den Phagen F 166 L cotransduzierbar sind. Da die Genloci der Strukturgene verschiedener Exoprodukte beispielsweise *pvd* und *toxA* nicht auf einem bevorzugten Abschnitt des Genoms gefunden wurden (vergl. Genkarte in Abb.5), ordnete sich der *lip*-Locus mit seiner Mittellage problemlos in dieses Verteilungsmuster ein. Die Anordnung von relevanten Genen dieser Untersuchung, wozu die Strukturgene bekannter Exoprodukte, sowie Gene der Transport- und/oder Regulationsmechanismen gehörten, wurde in Abb. 5 dargestellt. Das Bild berücksichtigt gleichzeitig die Rekalibrierung des *P. aeruginosa* PAO1-Chromosoms (O'HOY & KRISHNAPILLAI, 1987).

Bezeichnungen der Gene nach HOLLOWAY & MATSUMOTO (1984)
lip: Fehlen extrazellulärer Lipaseaktivität

Abb. 5 Genkarte des Chromosoms von *P. aeruginosa* PAO1 mit Genmarken, die für diese Untersuchungen relevant waren

(a) Genkarte nach HOLLOWAY & MATSUMOTO (1984)

(b) rekalibrierte Genkarte nach O'HOY & KRISHNAPILLAI
 (1987)



3.5. Klonierung des Lipase-Gens von *P. aeruginosa* PAO1

Die Klonierungsstrategien mußten sich an den eingeschränkten Möglichkeiten zur Auffindung eines positiven Lipase-Klons orientieren. Ein Screening war lediglich über die Aktivitätsbestimmung eines vollständig exprimierten Genproduktes möglich: Antikörper oder eine radioaktive Sonde (basierend auf Aminosäure-Sequenzdaten) waren nicht verfügbar oder herzustellen, da das Lipase-Enzym noch nicht in ausreichenden Mengen gereinigt werden konnte. Versuche, das Lipase-Gen im molekulargenetisch gut definierten *E. coli*-System zu klonieren, wurden dadurch erschwert und erbrachten auch nicht den gewünschten Erfolg. Um Expressions- und Lokalisierungsschwierigkeiten bei Klonierung in einen heterologen Wirt zu überwinden, wurde die *lip*-Strukturgenmutante 6-1 von *P. aeruginosa* PAO ausgewählt (vergl. 3.3.), um positive Klone direkt auf Grund ihres Komplementationsverhaltens erkennen zu können.

3.5.1. Klonierungsversuche im heterologen Wirt *E. coli*

Hier sollen nur zwei der durchgeführten, grundsätzlich verschiedenen Klonierungsstrategien für *E. coli* dargestellt werden, die, wie alle übrigen Versuche in diesem Wirtssystem auch, nicht zu dem gewünschten Ziel führten.

Mit Hilfe des positiven *E. coli*-Klonierungsvektors pUN121 (NILSSON et al., 1983) wurden zwei Genbanken in *E. coli* MT102 erstellt, die einerseits Eco RI- und andererseits Hind III-Fragmente partiell verdauter *P. aeruginosa* PAO1-DNA (Isolierung: 2.16.1.) in dem entsprechend vorbereiteten Vektor trugen. Durch Restaurierung der plasmidalen Tetracyclin-Resistenz in rekombinanten Klonen konnten diese direkt auf LB-Agarplatten mit 8 µg/ml Tetracyclin selektiert werden. 5700 Klone der Eco RI-Genbank, mit durchschnittlich 5 kb einklonierter Fremd-DNA, wurden je in 0,22 ml M9-Minimalmedium (supplementiert mit 1 µg/ml Thiamin, 0,5 % Casamino Acids und 8 µg/ml Tetracyclin) in Mikrotiterplatten angezüchtet. Stationäre Kulturen wurden dann mit jeweils 0,1 ml pNPP-Substratemulsion (2.12.1.) eine Stunde im Dunkeln bei 37°C inkubiert, bevor das Ergebnis abgelesen wurde. Ein positiver Klon konnte nicht gefunden werden. Auch unter weiteren 2000 Klonen derselben Genbank und 2000

Klonen einer vergleichbaren Hind III-Genbank, die auf CT-Agarplatten (2.2.) untersucht wurden, wurde kein positiver Lipase-Klon entdeckt.

Der zweite Klonierungsansatz knüpfte an die Kartierungsexperimente für das Lipase-Gen (3.4.) an, die eine relative Nähe von 20 bzw. 25 kb zum Gen der Orotidin-5-phosphat Decarboxylase (*pyrF*) ergeben hatten (3.4.3.). Dieses Ergebnis sollte in einem Cosmidklonierungsversuch ausgenutzt werden, wobei DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 40 kb übertragen werden können. Hierzu wurde eine Sau3A-Genbank, die mit dem Cosmid pcos2EMBL (POUSTKA et al., 1984) erstellt wurde, über ein λ -Phagen-Verpackungs- und Infektionssystem (HOHN, 1979) in den *E. coli*-Stamm SK1108, der den Gendefekt *pyrF* trägt, transferiert. Die Selektion erfolgte direkt auf M9-Minimalagarplatten (mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Thiamin) zur Überprüfung einer Komplementation des *pyrF*-Defekts. Da bereits der *E. coli*-Stamm Kanamycin-resistent war, mußte der sehr strikte Selektionsdruck in Form eines Minimalmediums zur Ermittlung cosmidtragender Klone angewendet werden. Die erhaltenen Klone sollten dann hinsichtlich eines möglicherweise gleichzeitig übertragenen Lipase-Gens überprüft werden. Auch aus diesem Versuch ging kein Lipase-Klon hervor.

3.5.2. Klonierung im homologen Wirt *P. aeruginosa* PAO

Eine Übersicht zu dieser 2-Stufen-Klonierungsstrategie wird in Abb. 6 gegeben.

Zur Erstellung einer Genbank wurde die *P. aeruginosa* PAO1-DNA, wie unter 2.16.1. beschrieben, isoliert und anschließend mit der Restriktionsendonuklease Sal I partiell verdaut (2.19.1.). Auf einem Agarosegel (2.21.1.) wurde überprüft, daß die Hauptmenge der entstandenen Fragmente nicht kleiner als 2 kb war. In parallelen Ansätzen wurden ungefähr 0,4 μg bzw. 0,8 μg der partiell verdauten *P. aeruginosa* PAO1-DNA mit je ca. 0,4 - 0,8 μg Vektor-DNA verknüpft (2.19.3.). Als Vektor diente das Plasmid pKT248 (Abb. 7) (BAGDASARIAN et al., 1981), das einen weiten Wirtsbereich besitzt und für die Antibiotika-Resistenzen Streptomycin und Chloramphenicol kodiert. Es war durch vollständige Hydrolyse mit Sal I (inaktiviert das Chloramphenicol-Resistenzgen) und Dephosphorylierung (2.19.2.) vorbereitet worden. Mit den aufgeteilten Ligationsan-

sätzen (2 x 1/4 und 1 x 1/2 Volumen) wurden sechs unabhängige Transformationen des *E. coli*-Wirtsstammes SK1108 ausgeführt (2.20.2.). Durch Selektion auf LB-Agarplatten (2.2.) mit je 50 µg/ml KM und SM sowie einer Supplementation mit 1 mM Uracil wurden ca. 10600 Klone erhalten. Zur Überprüfung, ob sie rekombinante Plasmide trugen, wurde eine Kontraselektion auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml CM (statt SM), 50 µg/ml KM und 1 mM Uracil vorgenommen. Gleichzeitig wurde auch die Komplementation des *pyrF*-Defekts von *E. coli* SK1108 auf M9-Minimalagarplatten (supplementiert mit 1 µg/ml Thiamin, 1 mM Threonin, 50 µg/ml KM und SM) getestet. Dabei wurden direkt vier *pyrF*-Klone aus drei unabhängigen Transformationsansätzen selektiert, die aber nicht gleichzeitig das Lipase-Gen von *P. aeruginosa* PAO1 trugen (vergl. 3.5.1.).

Mit einer durchschnittlichen Größe der einklonierten DNA-Fragmente von 6,5 kb - bestimmt durch stichprobenartige Restriktionsanalyse verschiedener, rekombinanter Plasmide - ließ sich nach der Formel von CLARK & CARBON (1976):

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

errechnen, daß unter ca. 2200 Klonen der gewünschte mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % vorkommt (Größe des Chromosoms von *P. aeruginosa* PAO1: $2,1 \times 10^9$ D (PEMBERTON, 1974)).

Insgesamt 6000 der aus der Kontraselektion hervorgegangenen Klone wurden weiterbearbeitet. Auf 120 LB-Agarplatten (50 µg/ml SM) wurden jeweils 50 Klone übertragen, bebrütet und nach Überstempeln auf dasselbe Medium vermehrt. Je Platte wurden die Zellen aller 50 Kolonien mit 10 ml LB-Medium abgeschwemmt und daraus die Plasmide isoliert (2.16.2.), so daß entsprechend 120 gemischte Plasmidpräparate (Mini-Präps) erhalten wurden. Die Hälfte (25 µl) eines solchen Ansatzes wurde verwendet, um kompetente *P. aeruginosa*-Zellen des *lip*-Stammes 6-1 zu transformieren (2.20.1.); was zu ca. 2000 - 2500 Transformanten pro selektiver Agarplatte (NB-Agar, 50 µg/ml SM) führte. Der "Umweg" über den *E. coli*-Wirt war nötig, da sich *P. aeruginosa* mit DNA in "open circular" Form, wie sie in einem Ligationsansatz vorliegt, nicht mit einer für die Erstellung einer Genbank ausreichenden Frequenz transformieren ließ (Ergebnisse aus Vorversuchen, nicht dargestellt). Nach Überstempeln der selektierten Bakterienklone auf CT-Agarplatten (2.2.) konnten aus einem der 120 Ansätze (No. 81) 10 Lipase-produzierende Transformanten isoliert werden. Durch Klonanalyse derselben wurde gezeigt,

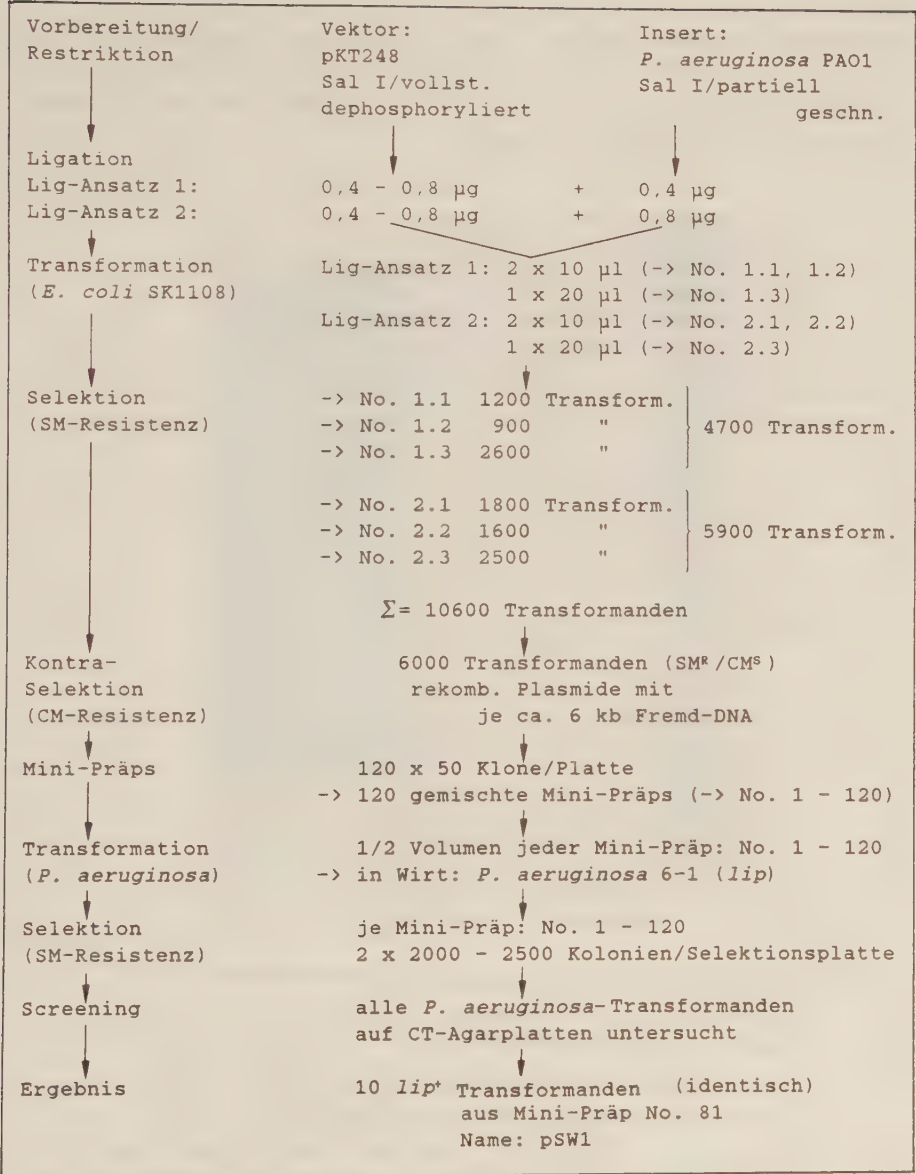
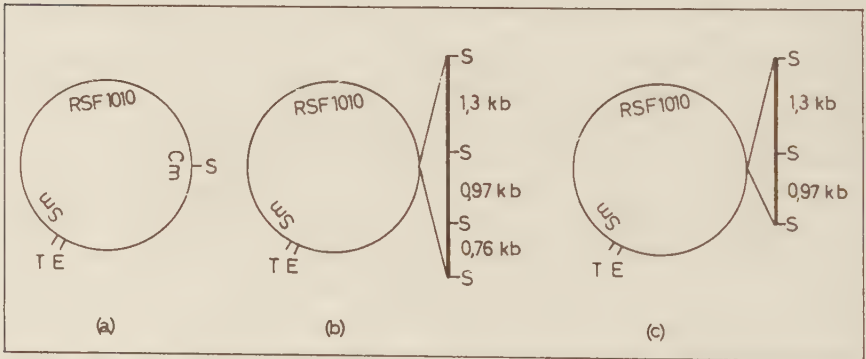


Abb. 6 Schematische Übersicht der Klonierungsstrategie für das Lipase-Gen aus *P. aeruginosa* PAO1 im homologen Wirtssystem (detaillierte Beschreibung unter 3.5.2.)

daß sie alle das gleiche rekombinante Plasmid trugen und es sich somit nicht um verschiedene Klone, sondern um Abkömmlinge nur eines Klones handelte. Das rekombinante Plasmid mit der Fähigkeit, den Lipase-Defekt der Mutante 6-1 von *P. aeruginosa* zu komplementieren, wurde mit pSW1 bezeichnet.

3.6. Charakterisierung des Plasmids pSW1

Die Größenbestimmung des rekombinanten Plasmids pSW1 erfolgte nach vollständiger Restriktion mit der Endonuklease Sal I (2.19.1.). Die erhaltenen Fragmente wurden im Agarosegel (1 %) aufgetrennt,



Sm: Streptomycin-Resistenzgen

Cm: Chloramphenicol-Resistenzgen

Replikon: RSF1010

Restriktionsschnittstellen: Sal I (S); Eco RI (E); Sst I (T)

—: einklonierte DNA aus *P. aeruginosa* PA01

Abb. 7 Graphische Darstellung des Klonierungsvektors pKT248 (a) und der rekombinanten Plasmide pSW1 (b) und pSW101 (c)

mit Ethidiumbromid angefärbt (2.21.1.) und an Hand von Molekulargewichtsstandards bekannter Größe (λ -DNA mit Eco RI und Hind III verdaut) bewertet. Demnach addierte es sich aus dem Klonierungsvektor pKT248 mit 12,4 kb und drei Sal I-Fragmenten der Größen: 1,3 kb; 0,97 kb und 0,76 kb zu einem Gesamtmolekulargewicht von 15,5 kb (Abb. 7(b) und 8(c)).

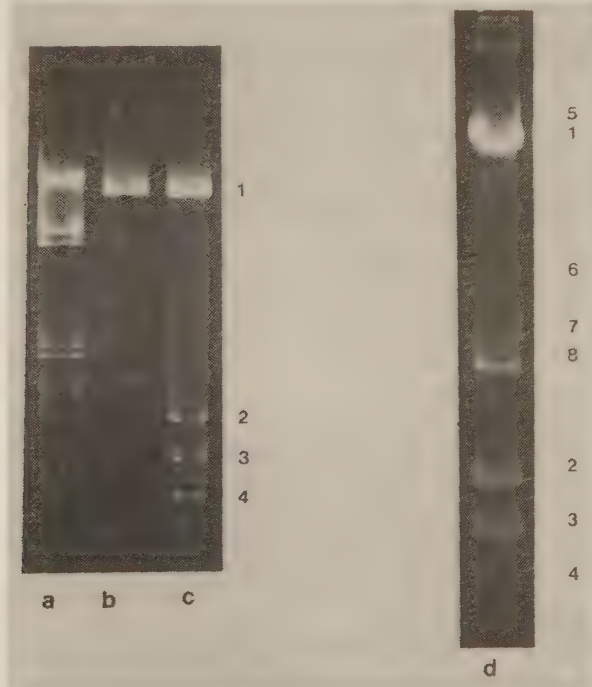


Abb. 8 Darstellung der Plasmide pSW1 und pKT248 im Agarosegel

- (a) Molekulargewichtsstandard: λ -DNA mit Eco RI/Hind III fragmentiert
- (b) pKT248 Vektor-DNA, linearisiert
- (c) pSW1 mit Sal I vollst. restringiert
 - (1) Vektor-DNA: 12,4 kb
 - (2) Sal I-Fragment 1: 1,3 kb
 - (3) Sal I-Fragment 2: 0,97 kb
 - (4) Sal I-Fragment 3: 0,76 kb
- (d) pSW1 mit Sal I partiell restringiert
 - (1) - (4) siehe (c); zusätzlich:
 - (5) pSW1 Plasmid-DNA, ungeschnitten
 - (6) Sal I-Dreifachfragment 1+2+3: 3,1 kb
 - (7) Sal I-Doppelfragment 1+2: 2,27 kb
 - (8) Sal I-Doppelfragment 1+3: 2,06 kb

Wie Abb. 7 schematisch verdeutlicht, wurden die drei Sal I-Subfragmente als ein zusammenhängender DNA-Abschnitt in das Chloramphenicol-Resistenzgen des Vektors pKT248 integriert. Ihre relative Lage zueinander konnte durch partielle Hydrolyse des Plasmids pSW1 mit dem Restriktionsenzym Sal I analysiert werden (Abb. 8(c)). Eine Bestätigung dieser Zuordnung ergab sich aus den Ergebnissen der unter 3.6.1. aufgeführten Subklonierungsexperimente (vergl. auch Abb. 9).

Ergebnisse aus Southern-blotting Experimenten (durchgeführt von C. Schmitt), in denen das mit ^{32}S -dATP markierte Sal I-Doppelsegment 1+2 (Begründung siehe: 3.6.1.) bei Hybridisierung an partiell verdauter, im Agarosegel aufgetrennte chromosomale DNA von *P. aeruginosa* PAO1 intensive und spezifische Hybridisierungssignale zeigte, machten deutlich, daß beide Sal I-Fragmente ursprünglich aus diesem Organismus stammen mußten. Das Versuchsergebnis ließ außerdem die Aussage zu, daß nur eine Kopie des Lipase-Gens pro Chromosom vorliegt. Mit *E. coli*-Kontroll-DNA wurde keinerlei Homologie, d. h. Hybridisierung, festgestellt.

3.6.1. Subklonierung des Plasmids pSW1

Dieser Versuchsteil basierte in Analogie zur Klonierungsstrategie (3.5.2.) ebenfalls auf einer 2-Stufen DNA-Übertragung mit anschließender Komplementationsstudie in der *lip*-Mutante 6-1 von *P. aeruginosa* PAO.

Das Plasmid pSW1 wurde zunächst mit der Restriktionsendonuklease Sal I partiell verdaut (Überprüfung im Agarosegel). Das resultierende Gemisch mit allen Subfragmentkombinationen wurde direkt in den vorbereiteten (Sal I geschnitten (2.19.1.); dephosphoryliert (2.19.2.)) Vektor pKT248 ligiert (2.19.3.) und anschließend in *E. coli* JM109 transformiert (2.20.2.). Nach Selektion auf die Übertragung von SM-Resistenz und Kontraselektion auf CM-Sensitivität (vergl. 3.5.2.) wurden aus 220 Klonen vier Präparate mit je ca. 50 verschiedenen rekombinanten Plasmiden erstellt (2.16.2.), um damit die *P. aeruginosa lip*-Mutante 6-1 zu transformieren (2.20.1.). 24% der auf CT-Agarplatten (2.2.) überprüften Transformanten zeichneten sich durch Komplementation des *lip*-Defekts aus. In einer Plasmidpräparationsserie (2.16.2.) wurden die rekombinanten Plas-

mide von *lip*⁺- und *lip*-Kolonien überprüft. Sie enthielten alle Sal I-Fragmentkombinationen, wie sie auf Grund der Partialhydrolyse-Ergebnisse (3.6.; Abb. 8 (c)) zu erwarten waren. Eine Übersicht, welche der DNA-Abschnitte zur Expression des Lipase-Gens notwendig waren, wird in Abb. 9 gegeben. Wie erwartet komplementierte das Sal I-Dreierfragment und außerdem auch das Sal I-Doppelfragment, welches nur aus den beiden größeren Subfragmenten 1+2 (1,3 kb und 0,97 kb) zusammengesetzt war. Da kein anderes Einzelfragment den Lipase-Defekt von Mutante 6-1 restaurieren konnte, mußte das Lipase-Gen demnach eine Sal I-Schnittstelle tragen. Außerdem zeigte dies Ergebnis, daß Sal I-Subfragment 1 und 2 natürlicherweise zusammengehören und nicht während des Klonierens aneinandergehängt wurden. Eine diesbezügliche Aussage über das dritte Fragment war nicht möglich.

Das aus dieser Subklonierung erhaltene Plasmid, welches das Lipase-Gen auf einem Sal I- Doppelfragment 1+2 trug, wurde mit pSW101

Fragmente (1-3) in kb			Komplementation des <i>lip</i> -Gendefekts der Mutante 6-1
0,97 (2)	1.3 (1)	0,76 (3)	
-----	+	-----	+
-----	+	-----	+
		-----	-
-----			-
	-----		-
		-----	-

+ : Komplementation; positives Ergebnis auf CT-Agarplatten
- : keine Komplementation; negatives Ergebnis auf CT-Agarplatten

Abb. 9 Subklonierung des Sal I-Dreifachfragmentes aus pSW1 durch Komplementationstests mit der *lip*-Mutante 6-1 von *P. aeruginosa* PAO (Vektor: pKT248)

bezeichnet (ca. 14,7 kb; Abb. 7 (c)). Es wurde Grundlage aller weiteren Versuche.

3.6.2. Restriktionsanalyse des Plasmids pSW101

Die zwei Sal I-Subfragmente des 2,3 kb Doppelfragments aus dem Plasmid pSW101 wurden getrennt mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut (2.19.1.). Parallel dazu wurde das gesamte Plasmid pSW103 (3.7.2.) und zur Kontrolle der Enzymaktivität λ -DNA, für die das entsprechende Restriktionsmuster bekannt war, bearbeitet. Die Verdauung des intakten Sal I-Doppelfragments gleichzeitig mit mehreren der Endonukleasen zusätzlich zu partiellen Einzelverdauungen ergab Aufschluß über die Lage der Restriktionsschnittstellen zueinander. Alle DNA-Größenbestimmungen erfolgten an Hand von λ -Eco RI/Hind III Molekulargewichtsstandards nach Auftrennung in 1,2 - 1,7 %igen Agarosegelen und Ethidiumbromid-Färbung (2.21.1.). Aus der Kenntnis, daß die *P. aeruginosa*-DNA einen G/C Basenanteil von 67 % aufweist, wurden bevorzugt Restriktionsenzyme mit entsprechenden Erkennungssequenzen ausgewählt; sie wurden im Folgenden mit "*" gekennzeichnet:

keine Schnittstelle für: Bam HI*, Bst EII*, Dra I, Eco RV,
Hind III, Kpn I*, Nco I*, Pvu II*,
Sma I*, Sst I*

eine Schnittstelle für: Sal I* (1,30 kb/0,97 kb)
großes Fragment: Ava II* (1,15 kb/0,15 kb),
kleines Fragment: Acc I (0,63 kb/0,34 kb),
Ava I* (0,82 kb/0,15 kb),
AvaII* (0,70 kb/0,27 kb),
Eco RI (0,62 kb/0,37 kb),
Pst I* (0,56 kb/0,41 kb)

zwei Schnittstellen für:

großes Fragment: Pst I* (0,80 kb/0,40 kb/0,10 kb)

viele Schnittstellen für: Hae II*, Hinf I, Sau 3A

Wie erwartet schneiden diejenigen Restriktionsendonukleasen, die nur eine 4er- oder 5er-Erkennungssequenz benötigen, die DNA-Ab-

schnitte oft. Auffällig ist, daß für einige G/C-Sequenzen bevorzugende Enzyme (Bam HI und Sma I) keine Schnittstellen gefunden werden konnten. Aus den Ergebnissen obiger Einzelverdauungen und der hier nicht im Detail dargestellten Doppelverdauungen ergab sich eine vorläufige Restriktionskarte für das Lipase-Gen tragende 2,3 kb große Sal I-Doppelfragment aus pSW101. Diese Karte diente als Grundlage für Vorarbeiten zur gezielten ("forced") Sequenzierung des DNA-Abschnitts (3.8.2.). Da sie mit der detaillierten Restriktionskarte, die auf Daten der Sequenzanalyse basiert, gut übereinstimmt, wird auf diese in Anhang 2 verwiesen.

3.7. Expression des klonierten Lipase-Gens von *P. aeruginosa* PAO1

Das durch Komplementation im *lip*-Stamm 6-1 von *P. aeruginosa* gefundene Lipase-Gen sollte sowohl auf Funktion in *E. coli* als auch in *P. aeruginosa* überprüft werden. Es wurde eine uneingeschränkte Expression des Gens im homologen Wirt erwartet. Im heterologen Wirt war mit einer verminderten oder sogar fehlenden Expression zu rechnen, sofern das betroffene Gen nicht von einem *E. coli*-Promotor her abgelesen wurde. Diese Annahme war auf Grund von Ergebnissen aus der Literatur berechtigt, in denen Expressionsversuche und *Pseudomonas*-Promotorstrukturen beschrieben wurden (vergl. 1. -Sequenzierung). In die gleiche Richtung deutete der mangelnde Erfolg, das Lipase-Gen direkt in *E. coli* zu klonieren und über eine Aktivitätsbestimmung des Genprodukts zu suchen.

3.7.1. Expression im homologen Wirtssystem

In dieser Versuchsserie wurde das Lipase-Gen-tragende Plasmid pSW101 in drei verschiedene Klassen von *P. aeruginosa*-Stämmen durch Transformation (2.20.1.) übertragen. Erstens wurden der Lipase-produzierende Wildtypstamm PAO1 und der ebenfalls *lip*⁺-Stamm PAO2302, der als Elternstamm der *lip*-Mutanten (3.2.) diente, ausgewählt. Zweitens dienten die *lip*-Mutanten 29-1 und 6-1, deren fehlende extrazelluläre Lipaseaktivität auf eine Veränderung des Lipase-Strukturgens zurückgeführt wurde (3.3.), als Rezipienten des rekombinanten Plasmids pSW101. Außerdem wurden drittens die Lip⁻-

Mutanten 28-1 und 17-1 (vergl. 3.3.) transformiert, deren Gendefekt nicht identifiziert wurde. Die Bezugstämme (jeweils ohne Plasmid) wurden in NB-Vollmedium, die abgeleiteten plasmidtragenden Stämme unter Selektionsdruck (NB-Vollmedium, 50 µg/ml SM) 16 h bei 30°C und mäßiger Belüftung angezüchtet. Dann wurde die Lipaseaktivität im Kulturmedium, aus dem die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt worden waren, mit Hilfe des pNPP-Tests bestimmt (2.12.1.).

Stamm	Lipaseaktivität		Bemerkung
	- pSW101	+ pSW101	
PAO1	15,5	38,1	Erhöhung der Aktivität um das 3 bis 4fache
PAO2302	11,0	38,7	
29-1	2,1	10,0	Wiederherstellung der Wildtyp-Aktivität
6-1	3,1	13,7	
28-1	3,3	2,5	kein Einfluß
17-1	3,3	2,8	

Anzuchtbedingungen: 16 h, 30°C, NB-Vollmedium (ggf. 50 µg/ml SM)

Aktivitätsbestimmung: im pNPP-Test (2.12.1.) in

$\text{EU}_{\text{pNPP}} \cdot \text{O.D. } 580^{-1}$

Tab. 11 Expression des durch pSW101 kodierten Lipase-Gens aus *P. aeruginosa* PAO1 im homologen Wirtssystem bei Berücksichtigung verschiedener genetischer Grundmuster der Wirtsbakterien

Die in Tab. 11 aufgelisteten Ergebnisse zeigten deutlich, daß das von pSW101 kodierte Gen den Enzym-Defekt der Lipase-Strukturgenmutanten 29-1 und 6-1 wenigstens bis zur Wildtypaktivität ausgleichen konnte. Der Lipase-Defekt von Mutanten mit Veränderungen in Regulation und/oder Export des Exoenzyms (beispielsweise 28-1 und 17-1), konnten durch pSW101 nicht komplementiert werden, was sich im Fehlen von extrazellulärer Lipase-Aktivität der entsprechenden, plasmidtragenden Stämme zeigte. Für die Lipase-positiven

Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und PAO2302 galt eine erhöhte Lipase-Aktivität im Kulturmedium bei zusätzlicher Anwesenheit des plasmid-kodierten Lipase-Gens. Die Erhöhung der Lipase-Aktivität durch das von pSW101 kodierte Gen auf das Drei- bis Vierfache war auf einen Gendoseneffekt zurückzuführen. Angaben aus der Literatur, nach denen von RSF1010 abgeleitete Plasmide in bis zu 10 Kopien pro Zelle vorliegen sollen (BAGDASARIAN et al., 1981), konnten nicht bestätigt werden, man darf lediglich wenige Kopien pro Zelle erwarten (Versuche dazu nicht dargestellt). Die Überprüfung zellgebundener Lipase-Aktivität (pNPP-Test an ganzen Zellen) von *P. aeruginosa*-Stämmen mit oder ohne Plasmid pSW101 lieferte Ergebnisse mit demselben Aussagewert wie die Messungen der extrazellulären Enzymaktivität.

3.7.2. Expression im heterologen Wirtssystem

Es fanden zwei verschiedene Expressionssysteme mit *E. coli* als heterologem Wirt Anwendung:

1. pUC-Vektorsystem, IPTG-Induktion des *lac*-Promotors
2. pT7-Vektorsystem, nicht Rifampicin-hemmbarer Ablesung des T7 Promotors ϕ 10 durch die T7 RNA-Polymerase

Die Vorbereitungen für beide Expressionsversuche waren prinzipiell gleich. Das Lipase-Gen tragende 2,3 kb Sal I-Doppelsegment aus pSW101 wurde mit Hilfe der allgemeinen Methoden zur *in vitro* Rekombination von DNA (2.19.) in die Vektoren pUC19 und pT7-6 umkloniert. Die Selektion rekombinanter pUC19-Plasmide in *E. coli* JM109 erfolgte durch Ausnutzung der α -Komplementation (2.2.). Die Übertragung der pT7-6-Derivate in *E. coli* K38 (pGP1-2) wurde mit Hilfe der erlangten Ampicillin-Resistenz überprüft. Da ein symmetrisches Sal I-DNA-Fragment in die Vektoren ligiert wurde, mußten die erhaltenen, rekombinanten Plasmide auf die relative Lage der Fragment-DNA zum plasmidkodierten Promotor überprüft werden. Dazu wurde die Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym Eco RI vollständig verdaut (2.19.1.). Aus der Kenntnis der Lage der einzigen Eco RI-Schnittstelle der eingefügten *P. aeruginosa*-DNA (3.6.2.) und die Anordnung einer ebensolchen Erkennungssequenz in der multiplen

Klonierungsregion der verwendeten Vektoren, konnte aus den jeweils speziellen Fragmentierungsmustern die Beschreibung der relativen Orientierung des 2,3 kb Sal I-Fragments abgeleitet werden. Lag die Eco RI-Schnittstelle der Insert-DNA näher zum Promotor des Vektors, wurde die Anordnung als Orientierung "A" bezeichnet, war die Erkennungsstelle weiter entfernt, wurde dies als Orientierung "B" definiert. Demzufolge ergaben sich die auf dem Vektor pUC19 basierenden, neu konstruierten Plasmide pSW103A und B, sowie die von pT7-6 abgeleiteten Plasmide pSW104A und B.

Induktionsversuche des Lipase-Gens, das entweder auf dem Plasmid pSW103A oder B den *E. coli lac*-Promotor vorgeschaltet haben sollte, wurden sowohl in M9-Minimal- als auch LB-Vollmedium (2.2.) unter Selektionsdruck durchgeführt. Die Zellen von *E. coli* JM109, die das jeweilige rekombinante Plasmid enthielten, und ebenfalls die Kontrollzellen mit pUC19, wurden in verschiedenen Versuchsansätzen bis zum Erreichen der exponentiellen oder spät-exponentiellen Wachstumsphase bei 37°C angezüchtet und dann mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. 2 h bzw. 16 h später wurde die Lipase-Aktivität im Medium (pNFP-Test, 2.12.1.) gemessen. Außerdem wurden die Bakterienzellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten in Sørensen-Puffer (2.3.) auf 1/10-1/16 Volumen konzentriert, durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und ebenfalls auf Lipase-Aktivität (pNPP-Test, 2.12.1.) untersucht. Weder im Medium (=extrazellulär) noch im Zellysat (=intrazellulär/ zellgebunden) konnte unter den verschiedenen Bedingungen (Anzuchten, Zeitpunkt der Probennahme, Orientierung des klonierten DNA-Fragments) Lipaseaktivität, die dem Produkt des einklonierten Gens zuzuordnen wäre, nachgewiesen werden.

Die Plasmide pSW104A und B wurden in einem Expressionssystem nach TABOR & RICHARDSON (1985) untersucht. Dazu wurden die *E. coli* K38-Wirtsbakterien, die neben dem Helferplasmid gGP1-2 eines der rekombinanten Plasmide bzw. pT7-6 (Kontrolle) enthielten, in LB-Vollmedium unter Selektionsdruck (40 µg/ml AP und KM) bei 30°C bis zum Erreichen der spät-exponentiellen Wachstumsphase angezüchtet. Die Kulturen wurden geteilt, einerseits als Kontrolle bei 30°C weiterbebrütet und andererseits wurde zum Start des Expressionssystems der temperatursensitive λ -Repressor bei 42°C (15 min) zerstört, um die Synthese der T7 RNA-Polymerase zu induzieren. Durch Zugabe von Rifampicin (100 µg/ml) - 15 min, 42°C - wurde die zelluläre RNA-

Polymerase inaktiviert, so daß in den folgenden 2 h bei 37°C lediglich die unter den T7 RNA-Polymerase abhängigen Promotor ($\phi 10$) klonierte DNA abgelesen wurde. Zwei Versuche wurden mit den so präparierten Zellen und den zugehörigen Kontrollansätzen durchgeführt:

(a) Lipase-Aktivitätsbestimmung und

(b) Proteindarstellung im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel.

Zur Aktivitätsbestimmung (a) wurden die Zellen um den Faktor 8 in Sprensen-Puffer (2.3.) konzentriert und durch Ultraschallbehandlung desintegriert. Mit Hilfe des pNPP-Tests (2.12.1) wurde sowohl in der zuvor abgetrennten Kulturflüssigkeit als auch im Gemisch der aufgeschlossenen Zellen die Lipaseaktivität bestimmt. Für alle Kontroll- und Testansätze wurde die gleiche pNPP-Spaltungsaktivität erhalten, die auf Restaktivität intrazellulärer, *E. coli*-spezifischer Esterasen und Lipasen zurückzuführen war.

Die Vorbereitung der induzierten und nicht induzierten Zellen für die Auftrennung im Polyacrylamidgel (b) erfolgte durch Detergenzbehandlung. Die bei 100°C (5 min) solubilisierten Proteine wurden in einem unter 2.11.2. beschriebenen Gelsystem aufgetrennt und gefärbt. Alle Zellysate ergaben das gleiche Protein-Bandenmuster. Eine Differenz zwischen Kontroll- und induzierten Proben, sowie in Abhängigkeit von der Orientierung der eingefügten Fremd-DNA, war nicht zu beobachten.

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Expressionsversuchen im heterologen Wirtssystem ließen mehrere Interpretationsmöglichkeiten zu, die die mangelnde Lipaseaktivität erklären könnten (vergl.4.). Da aber im pT7-Expressionssystem unabhängig von der Orientierung des klonierten DNA-Abschnittes, bezüglich des entsprechenden $\phi 10$ -Promotors, kein zusätzliches Protein synthetisiert wurde, ist es naheliegend, daß das gesuchte Lipase-Gen noch unter der Kontrolle des *Pseudomonas*-eigenen Promotors steht, der in *E. coli* schlecht oder nicht erkannt wird, und Stoppsignale, die vor bzw. hinter dem Gen liegen, eine Synthese vom T7- bzw. *E. coli*-Promotor (*lac*-System) ausgehend verhindern. Demnach scheint eine Sequenzierung des betrachteten DNA-Fragments wichtig, um gezielt Subklonierungen für erfolgreiche Expressionsversuche anschließen zu können.

3.8. Sequenzierung des Lipase-Gens von *P. aeruginosa* PAO1

Um die Nukleotidsequenz des Lipase-Gens aufzuklären, mußte das gesamte 2,3 kb Sal I-Doppelfragment von pSW101 (3.6.1.) analysiert werden. Dies erfolgte mit der Didesoxyterminationsmethode nach SANGER et al. (1977), wobei die zwei Strategien der sogenannten gezielten ("forced") und "shot-gun" Sequenzierung verfolgt wurden. Das gesuchte Gen mußte im Bereich der das Fragment teilenden Sal I-Restriktionsschnittstelle angenommen werden, da Expressionsversuche nach Subklonierung der beiden Sal I-Einzelfragmente (1,3 und 0,97 kb) kein aktives Genprodukt lieferten (3.6.1.).

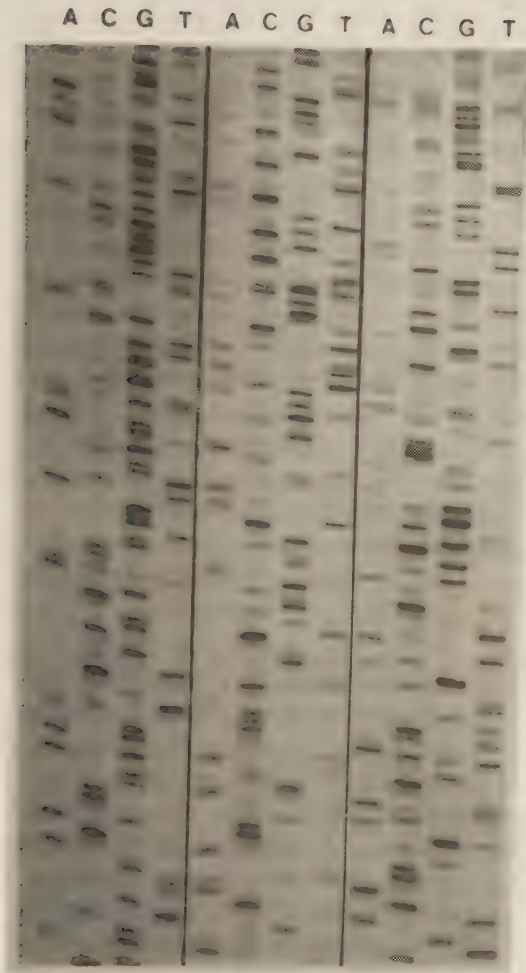
3.8.1. Vorbereitung der zu sequenzierenden Klone

Zur Konstruktion der rekombinanten M13mp18-Klone für die gezielte ("forced") Sequenzierung konnte auf den Ergebnissen der Restriktionsanalyse des Sal I-Doppelragments aufgebaut werden (3.6.2.). Aus den beiden getrennten Sal I-Subfragmenten wurden die jeweiligen Sal I/ Pst I-Restriktionsfragmente isoliert und in die Multi-klonierungssequenz des vorbereiteten Vektors M13mp18 eingefügt (2.24.). Außerdem wurden Sal I/Eco RI-Fragmente des 0,97 kb DNA-Abschnitts hergestellt und ebenfalls als rekombinante M13-Klone vermehrt.

Die Gewinnung der "shot-gun" Klone erfolgte nach der Methode von DEININGER (1983) und wurde unter 2.23. detailliert dargestellt. Aus insgesamt 120 der M13-Klone, welche auf α -Komplementationsagar (2.2.) als rekombinant erkannt wurden, wurde (ss) Einzelstrang-DNA isoliert (2.22.2.) und als "template-DNA" zur Sequenzierung eingesetzt.

3.8.2. Sequenzanalyse des 2,3 kb Sal I-Doppelragments

110 der unter 3.8.1 beschriebenen, rekombinanten M13mp18-Klone wurden sequenziert (2.25.). Sechs dieser Klone enthielten verschiedene, definierte Restriktionsfragmente (Analyse durch Hybridisierungsversuche; 2.23.), die aus den Vorarbeiten zur gezielten ("forced") Sequenzierung hervorgegangen waren (3.8.1.). Da die Ba-



Probenaufarbeitung : 2.25.1.

Gradientengelsystem : 2.26.

Auftragungsreihenfolge: A C G T

Abb. 10 Autoradiogramm einer typischen G/C-reichen DNA-Sequenz von *P. aeruginosa*, Ausschnitte aus dem Lipase-Gen

senzusammensetzung der DNA von *P. aeruginosa* bekanntermaßen einen hohen G/C-Anteil von ca. 67 % (BERGAN, 1981) erwarten läßt, wurde mit 7-Deaza-2'-dGTP anstelle von dGTP gearbeitet. Dies diente zur besseren Auflösung möglicherweise auftretender Sekundärstrukturen in G/C-reichen Abschnitten, die sich in Sequenzgelen dann als "Kompressionen" darstellen (MIZUSAWA et al., 1986). In Abb. 10 wurde ein typischer, G/C-reicher DNA-Abschnitt dargestellt, der einen Teil des gesuchten Lipase-Gens von *P. aeruginosa* PAO1 repräsentiert.

Die Ergebnisse aller sequenzierter Klone wurden in einer Sequenzdatei gesammelt und mit einem nach STADEN (1980) abgewandelten Computerprogramm auf dem Großrechner Cyber 855 ausgewertet. In Vergleichen der Einzelsequenzen wurden homologe DNA-Abschnitte verschiedener Klone aufgefunden und durch Aneinanderpassen dieser Abschnitte konnte die gesamte DNA-Sequenz sukzessive aufgebaut werden. Da in einer "shot-gun" Sequenzierung allgemein immer eine statistische Auswahl von Fragmenten des gesamten zu analysierenden DNA-Abschnitts untersucht wird, wurden einige DNA-Regionen mehrfach (in beiden Orientierungen), d. h. bis zu 11 mal sequenziert, andere dagegen überhaupt nicht. Um diese Fehlstellen zu überbrücken, wurden die Randklone der bereits zusammenhängenden Klone erneut sequenziert, wobei die erweiterten Sequenzierungsmethoden mit "extended Klenow" (2.25.2.) und Sequenase (2.25.3.) sowie der Einsatz entsprechender Langlaufgele (2.26.) erfolgreich angewendet wurden. Eine weitere Verfeinerung der Methoden wurde durch die Verwendung von dITP statt 7-Deaza-2'-dGTP zur Auflösung noch unklarer G/C-Sequenzen erzielt.

Aus 91 der sequenzierten Klone konnte eine zusammenhängende Sequenz für das 2,3 kb Sal I-Doppelfragment aus pSW101 erstellt werden (vergl. Anhang 1). Dazu waren 8680 bp sequenziert worden, was im Mittel eine Länge von 95 bp je gelesenem Klon ausmacht. Mehr Basenpaare waren trotz der Methoden, die den G/C-Reichtum der DNA berücksichtigten, nicht eindeutig aufzulösen. Die Anzahl der insgesamt gelesenen Basenpaare zeigte außerdem an, daß der betrachtete DNA-Abschnitt insgesamt fast 4 mal sequenziert wurde. Die Klone, welche nicht zur Sequenzfindung beitrugen, spiegelten entweder M13mp18-Sequenzen wider oder ihre Sequenzergebnisse waren mit zu vielen Ungenauigkeiten behaftet.

3.8.3. Sequenz des Lipase-Gens

Die in Anhang 1 dargestellte DNA-Sequenz des gesamten 2,3 kb DNA-Fragments wurde für die beiden gegenläufigen DNA-Stränge in jeweils den drei möglichen Leserahmen in zugehörige Aminosäuresequenzen übertragen. Bei Berücksichtigung einiger abgesicherter Randbedingungen (u.a.: Sal I-Schnittstelle im Gen/Größe des Lipase-Proteins/Aminosäuresequenz eines möglichen aktiven Zentrums) kam für die Lipase nur ein offener Leserahmen im Bereich der Nukleotide von Position 1260 bis 2180 in Betracht. Die DNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz für das Lipase-Gen wurden in der folgenden Abb. 11 dargestellt. Die Absicherung der erstellten DNA-Sequenz ergab sich aus der Mehrfachsequenzierung des gesamten Gens: maximal wurden 11, minimal 2 überlappende, gegenläufige Klone und im Durchschnitt an allen Stellen 4 - 7 Klone sequenziert. Eine Ausnahme bildete ein Abschnitt von 7 bp, der lediglich einmal untersucht wurde. Der DNA-Bereich, der für das vermutete aktive Zentrum des Proteins kodiert, wurde durch die Sequenzierung von 4 unabhängigen Klonen abgesichert.

3.8.4. Auswertung des offenen Leserahmens für die Lipase

Die allgemeinen Voraussetzungen, um an Hand einer Nukleotidsequenz einen offenen Leserahmen zu definieren, beziehen sich auf bekannte Start- und Stoppsignale: Startkodon, Ribosomenbindestelle, Promotorsequenzen, Stoppkodon und rho-unabhängige Terminatoren. Diese Parameter sollen bezüglich des offenen Leserahmens für die Lipase behandelt werden.

Startkodon

Es wurde das für Methionin (M oder Met) kodierende Triplet ATG (Pos. 1327) gefunden, das den Startpunkt der meisten Proteine charakterisiert. In entsprechender Entfernung konnten eine potentielle Ribosomenbindestelle bzw. Promotorsequenzen erkannt werden.

1270 P 1280 P 1290 1300 SD 1310 1320
 GAACAAATGCC GAAGAGCTTT TCGGAACCGT GGGACATCAG GGGGAAGACCG GTGCACGATA
 E Q C R R A F A N R G T S G E D R C T I

 1330 1340 1350 S 1360 1370 1380
 CGCAGGATGG CCAGGCCGGC ACCGGCGTTG GTCGACTACT GGTTCGGCAT TTCCCAGCGC
 R R M A R P A P A L V D Y W F G I S Q R
 orf
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTTGCGCGTG ACGGTGCCCA GGTCTACGTC ACCGAATGTC AGCCAGTTGG ACACTCGGAA
 L A R D G A Q V Y V T E C Q P V G H S E

 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GTCCGCGGCG AGCAGTTGCT GCAACAGGTG GAGGAAATCG TCGCCCTCAG CGGCCAGCCC
 V R G E Q L L Q Q V E E I V A L S G Q P

 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 AAGGTCAACC TGATCGGCCA CAGCCACGGC GGGCCGACCA TCCGCTACGT CGCCGCCGTA
 K V N L I G H S H G G P T I R Y V A A V
 A
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 CGTCCCGACC TGATCGTTCC GCCACCACGT CGGCGCCCCG CACAAGGGTT CGGACACCGC
 R P D L I V P P P R R R P A Q G F G H R

 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 CGACTTCCTG CGCCAGATCC CACCGGGTTC GGCCGGCGAG GCAGTCCTCT CCGGGCTGGT
 R L P A P D P T G F G R R G S P L R A G

 1690 1700 1710 1720 1730 E 1740
 CAACAGCCTC GGCGCGCTGA TCAGCTTCCT TTCCAGCGGC AGCACCGGTA CGCAGAATTC
 Q Q P R R A D Q L P F Q R Q H R Y A E F

 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACTGGGCTCG CTGGAGTCGC TGAACAGCGA GGGTGCCGCG CGCTTCAACG CCAAGTACCC
 T G L A G V A E Q R G C R A L Q R Q V P

 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GCAGGCATCC CCACCTCGGC CTGCGGCGAA GGCGCCTACA AGGTCAACGG CGTGAGCTAT
 A G I P T S A C G E G A Y K V N G V S Y

 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TACTCCTGGA GCGGTTCTCT GCCGCTGACC AACTTCCTCG ATCCGAGCGA CGCCTTCCTC
 Y S W S G S S P L T N F L D P S D A F L

 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GCGGCCTCGT CGCTGACCTT CAAGAACGGC ACCGCCAACG ACGGCCTGGT CGGCACCTGC
 G A S S L T F K N G T A N D G L V G T C
 L

1990	2000	2010	2020	2030	2040
AGTTCGCACC	TGGGCATGGT	GATCCGCGAC	AACTACCGGA	TGAACCACT	GGACGAGGTG
<u>S</u> <u>S</u> H	L G M V	I R D	N Y R	M N H L	D E V
2050	2060	2070	2080	2090	2100
AACCAGGTCT	TCGGCCTCAC	CAGCCTGTTC	GAGACCAGCC	CGGTCAGCGT	CTACCGCCAG
N Q V	F G L T	S L F	E T S	P V S V	Y R Q
2110	2120	2130	2140 T	2150	2160
CACGCCAACC	GCCTGAAGAA	CGCCAGCCTG	TAGGACCCCG	GCCGGGGCCT	CGGCCCCGCG
H A N	R L K N	A S L	* D P	G R G L	G P G
2170	2180				
CCTTTCCCGG	AAGCCCCTC				
P F P	E A P				

Abschnitt der DNA-Sequenz von Pos. 1260 - 2180 aus der in Anhang 1 dargestellten Gesamtsequenz des 2,3 kb Sal I-Doppelfragments aus pSW101

Sequenz der Proteinprimärstruktur: im Ein-Buchstabenkode

* : Stopp der AS-Kette

SD : Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz)

P : mögliche Promotorsequenzen

T : Terminationsstrukturen in Form von Haarnadeln

S : Sal I-Restriktionsschnittstelle

E : Eco RI-Restriktionsschnittstelle

A : aktives Zentrum des Proteins

L : mögliche Lipoproteinkonsensussequenz

orf: Start des offenen Leserahmens

Abb. 11 DNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz im Bereich des offenen Leserahmens, der für die Lipase kodiert

Ribosomenbindestelle (SD-Region)

Nach SHINE & DALGARNO (1974) und STORMO et al. (1982) muß einem Gen von *E. coli* im Abstand von 5 - 12 bp eine Ribosomenbindestelle mit der Sequenz AGGA oder GAGG vorangehen. Ähnliches gilt auch für *P. aeruginosa*-Gene (vergl. 1. und Tab. 12).

Für den offenen Leserahmen der Lipase wurde etwa 25 bp stromaufwärts vom Kodon der ersten Aminosäure (ATG) bei Pos. 1301 - 1307 eine potentielle SD-Region mit der Sequenzabfolge: GGGA, GGAA oder GAAG gefunden. Die Entfernung vom Startcodon war verglichen mit den Erwartungswerten ungewöhnlich groß, außerdem wies die SD-Sequenz eine den *Pseudomonaden* spezifische größere Variabilität auf (Tab. 12).

Promotorsequenzen

Wie unter 1. dargelegt, werden die Promotorsequenzen für *Pseudomonas*-Gene in wenigstens drei Klassen unterteilt, wobei Typ 2 und 3 durch Übergangsformen zusammenhängen.

Bei Position 1267-1272 (TGCCGA) und 1279-1285 (TTGCCGA) der aufgelisteten Sequenz, 41 bzw. 54 bp vom Startkodon entfernt, waren Sequenzen aufzufinden, die einem Typ 3 Promotor ähneln, der von einer σ^{60} abhängigen RNA-Polymerase erkannt wird (Tab. 12). Wie bereits bei der SD-Sequenz angemerkt, war auch hier der Abstand zum Gen relativ groß.

Termination

Der offene Leserahmen wurde durch ein amber-Stoppkodon (TAG) abgeschlossen. Zusätzlich folgte ein Sequenzabschnitt, der sich zu drei verschiedenen Haarnadelstrukturen (Abb. 12) auffalten läßt, wobei die in Abb. 12 (b) dargestellte Möglichkeit energetisch die stabilste und auch wahrscheinlichste ist; sie deutet auf eine rho-unabhängige Termination der Transkription hin.

Außer den bereits beschriebenen, allgemeinen Parametern zur Definition eines offenen Leserahmens wurden noch weitere Beobachtungen an der DNA-Sequenz gemacht, die teilweise in *Pseudomonaden*-Spezifika begründet waren.

Gen	SD	Promotoren		Bemerkung
<i>plc</i>	GGGA	-----	-----	kein Konsensus
<i>toxR</i>	AGAG	-----	-----	
<i>lip¹</i>	GAGA	-----	-----	
<i>algD</i>	GAGG	(-30) CTTCCC	(-12) CATCC	Typ 1: Konsensus?
<i>toxA</i>	AGGG	(-30) CTCCCC	(-12) CATCC	
		CTCCCC	CATCC	
<i>oprF</i>	GGGA	(-35) TTGTCT	(-10) TAAACT	Typ 2: Konsensus
		TTGACA	TATAAT	
Pili	GGAG	(-26) TTGGCATG	(-14) GTGCT	Typ 3: Konsensus
CPG2	GGAG	(-26) GTGGCACT	(-14) TTGCT	
<i>xylABC</i>	GGAG	(-26) ATGGCATG	(-14) TTGCT	
<i>xylR</i>	GGAG	(-24) TGGC	(-12) TTGC	
<i>lip²</i>	GGGA/ GGAA/ GAAG	- TGCCGA	- TTGCGA	
		CTGG*A**	TTGCA	
	AGGA/ GAGG			SD Konsensus

* : variable Nukleotidsequenz

algD : GDP-Mannose Dehydrogenase; *toxA*: Exotoxin A;

oprF : Porin F; Pili: Strukturprotein der Pili; (JOHNSON et al., 1986)

CPG2 : Carboxypeptidase G2; (MINTON et al., 1984)

xylABC : Benzoatabbau; (DIXON, 1986)

xylR : Regulatorgen des Benzoatabbaus (INOUE et al., 1984)

lip¹ : extraz. Lipase von *P. fragi* (KUGIMIYA et al., 1986)

lip² : extraz. Lipase von *P. aeruginosa* PAO1 (diese Arbeit)
weitere Literaturzitate: siehe 1. "Sequenzierung"

Promotorkonsensussequenzen:

Typ 1: noch unbekannt

Typ 2: wie *E. coli*; σ^{70} , *rpoD*

Typ 3: wie *E. coli*; σ^{60} , *rpoN*, *ntrA*

Tab. 12 Sequenzen für Ribosomenbindestellen (SD) und Promotoren verschiedener *Pseudomonas*-Gene

			T C		
			C-G		
			C-G		
	G-C		G-C		
	G-C		G-C		
	C-G		G-C		
	C-G		G-C		C
	C-G		C-G		C-G
	C-G		C-G		C-G
	A-T		G-C		T-A
	--GTAGG-CGGCC--		--CCCCG-CCTTT--		--CCTT-AGCCC--
Pos. 2130	2155	2136	2165	2161	2176
	(a)		(b)		(c)

Abb. 12 Darstellung von möglichen Haarnadelstrukturen zur rho-unabhängigen Termination des Lipase-Gens

Gen	G/C-Gehalt insgesamt (%)	G/C-Anteil der 3. Base (%)	Kodon- gebrauch
<i>toxA</i>	68,5	95,0	-
<i>trpBA</i>	68,0	92,2	-
<i>trpG</i>	67,2	84,1	48/64
<i>toxR</i>	66,4	80,0	53/64
<i>algD</i>	66,0	92,9	46/64
<i>lip²</i>	66,0	80,0	50/64
<i>plc</i>	65,6	88,7	-
<i>oprF</i>	62,0	78,0	-

Namen der Gene : vergl. Tab. 12; *trp*: Tryptophanbiosynthese
(HADERO & CRAWFORD, 1986)

Tab. 13 G/C-Gehalt und Kodongebrauch verschiedener *P. aeruginosa*-Gene

Basenverteilung und Kodongebrauch

Für das Lipase-Gen konnte ein G/C-Gehalt von 66 % ermittelt werden, was sehr gut mit Befunden für andere *P. aeruginosa*-Gene harmonierte (vergl. Tab. 13).

Weiterhin wurde für den einzig möglichen Leserahmen, der einen der Lipase entsprechenden Sequenzabschnitt repräsentierte, ein Gebrauch der Basen G oder C in der dritten Position des degenerierten Triplettkodes in 80 % der Fälle ermittelt (vergl. Tab. 13). Die anderen beiden potentiellen Leserahmen lagen mit 69 % oder 50 % G/C als dritter Base signifikant unter der für *Pseudomonas*-Gene gefundenen Verteilung (Tab. 13). Dies hat natürlich auch Auswirkungen auf den Gebrauch der 64 Kodons zur Aminosäuredeterminierung. Meist werden bei *P. aeruginosa* nur ca. 50 der verschiedenen Möglichkeiten ausgenutzt, was exakt für die Kodierung der Lipase zutraf. Nur zwei der reinen A/T-Kodons wurden je einmal verwendet. Eine genaue Darstellung über die Verteilung der benutzten Kodons findet sich in der folgenden Übersicht (Tab. 14).

regulatorische Sequenzen

20 bis 50 bp stromaufwärts einiger *Pseudomonas*-Gene wurden besondere, wiederkehrende Sequenzen (Abb. 13 (a)) beobachtet, denen eine regulatorische Funktion auf Transkriptionsebene zugeordnet wurde, ohne daß dieses bereits bewiesen wäre. Über 360 bp vom Startpunkt des Lipase-Gens entfernt konnte eine ebensolche Sequenz, die Teil einer Haarnadelstruktur war, aufgefunden werden (Abb. 13 (b)). Welche Funktion diese Struktur hier hat, ist völlig unklar, als Teil einer Sekundärstruktur könnte sie zur Erklärung beitragen, warum das Lipase-Gen in *E. coli* nicht von einem vorge-schalteten, wirtspezifischen Promotor abgelesen werden konnte (3.7.2.).

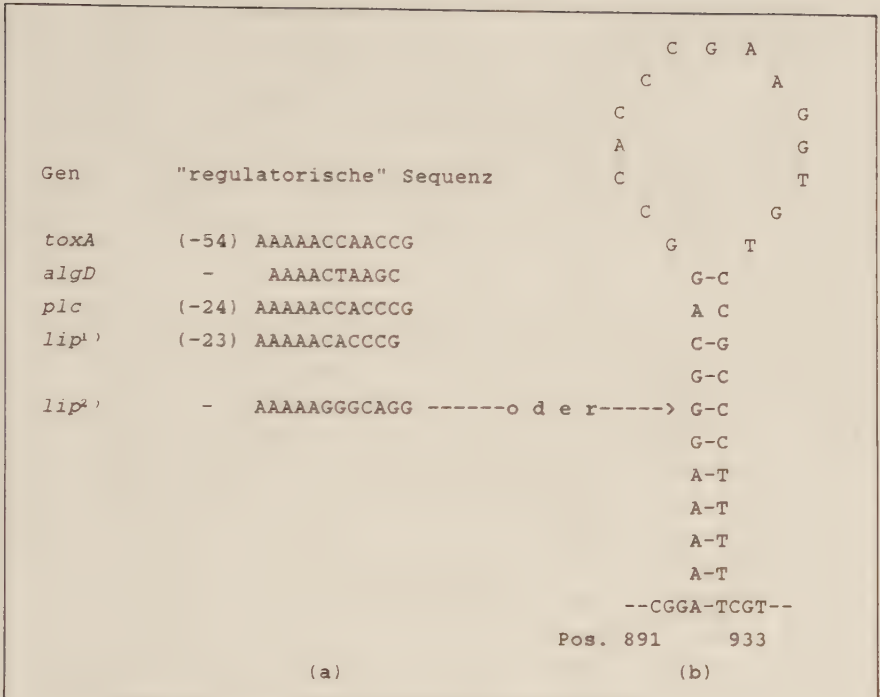
Restriktionsschnittstellen

Eine Gesamtübersicht der analysierten Restriktionsschnittstellen des sequenzierten 2,3 kb DNA-Abschnitts befindet sich in Anhang 2. Erkennungssequenzen, die sich im Lipase-Gen befinden, wurden besonders hervorgehoben. Diese detaillierte Restriktionskarte ergänzt das unter 3.6.2. mit Hilfe verschiedener Restriktionsendonukleasen aufgenommene, vorläufige Schnittmuster des Sal I-Doppel-fragments von pSW101.

AS	Kodon	Anzahl	AS	Kodon	Anzahl
Phe (F)	TTT	0	Tyr (Y)	TAT	1
	TTC	10		TAC	8
Leu (L)	TTA	0	Stop	TAA	0
	TTG	3		TAG	1
	CTT	4		TGA	0
	CTC	6	His (H)	CAT	0
	CTA	0		CAC	8
	CTG	10	Gln (Q)	CAA	5
Ile (I)	ATT	1		CAG	13
	ATC	6	Asn (N)	AAT	0
	ATA	0		AAC	10
Met (M)	ATG	3	Lys (K)	AAA	0
Val (V)	GTT	2		AAG	4
	GTC	14	Asp (D)	GAT	3
	GTA	2		GAC	7
	GTG	3	Glu (E)	GAA	6
Ser (S)	TCT	0		GAG	4
	TCC	3	Cys (C)	TGT	1
	TCA	0		TGC	3
	TCG	6	Trp (W)	TGG	2
	AGT	1	Arg (R)	CGT	4
	AGC	10		CGC	10
Pro (P)	CCT	4		CGA	3
	CCC	6		CGG	7
	CCA	4		AGA	0
	CCG	7		AGG	1
Thr (T)	ACT	1	Gly (G)	GGT	3
	ACC	10		GGC	17
	ACA	0		GGA	3
	ACG	0		GGG	5
Ala (A)	GCT	4			
	GCC	12			
	GCA	4			
	GCG	4			

AS: Aminosäuren; Namen im Drei- und Ein-Buchstabenkode

Tab. 14 Kodonverwendung im offenen Leserahmen für die Lipase



Namen der Gene: vergl. Tab. 12

Abb. 13 Sequenz 360 bp stromaufwärts vom offenen Leserahmen für die Lipase (*lip²*)

- (a) vergleichbare Sequenzen verschiedener *Pseudomonas*-Gene, möglicherweise zur Regulation der Transkription
- (b) Sequenz als Teil einer Haarnadelstruktur

3.8.5. Auswertung der abgeleiteten Aminosäuresequenz für das Lipase-Protein

Über die Proteinzusammensetzung der extrazellulären Lipase von *P. aeruginosa* PAO1 waren keine Daten vorhanden, so daß die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäureanordnung (Abb. 11) nicht überprüft werden konnte. Als Anhaltspunkte, daß der gefundene offene Leserahmen für eine Lipase kodierte, dienten auf Proteinebene zwei Tatsachen.

1. Für die extrazelluläre Lipase des nahe verwandten Stammes *P. aeruginosa* PAC1R war durch SDS-Gelelektrophorese ein apparentes Molekulargewicht von 29000 bestimmt worden (STOER et al., 1986). Die Molekulargewichte weiterer *Pseudomonas*-Lipasen (*P. fragi* (NISHIO et al., 1987); *P. fluoreszens* (SUGIURA & OIKAWA, 1977)) waren in der gleichen Größenordnung mit ca. 33000 ermittelt worden.
2. Das wahrscheinliche katalytische Zentrum verschiedener Lipasen zeigte (wie unter 1. "Lipasen" dargestellt) eine hoch konservierte Region der Aminosäureabfolge: (Ile)-Gly-His-Ser-X-Gly mit dem Serinrest als wichtigstem Bestandteil. Die *P. aeruginosa* PAC1R-Lipase ließ sich durch Serin-spezifische Substanzen vollständig hemmen (LEMMING, pers. Mitteilung).

Molekulargewicht und Proteinzusammensetzung

Die Aminosäuresequenz ergab sich aus Abb. 11; die summarische Zusammensetzung und das daraus errechnete Molekulargewicht für die extrazelluläre Lipase von *P. aeruginosa* PAO1 wurde in Tab. 15 dargestellt. Das hier ermittelte Molekulargewicht von 29181 stand in guter Übereinstimmung mit der Größe, die bereits gelelektrophoretisch für die *P. aeruginosa* PAC1R-Lipase bestimmt worden war. Eine Aussage über hydrophobe Domänen an der Enzymoberfläche, die nach Faltung der Aminosäurekette zu einem tertiären Produkt, sowie Stabilisierung desselben mit Hilfe der vier Cysteinreste, entstehen und somit zum amphiphilen Charakter der Lipase (ADRIAN, 1987) beitragen, war noch nicht möglich.

AS	Anzahl		Gewicht	
	absol.	in %	absol.	in %
Ala (A)	24	9	1704	5,8
Leu (L)	23	9	2599	8,9
Ile (I)	7	3	791	2,7
Val (V)	21	8	2079	7,1
Pro (P)	21	8	2037	7,0
Phe (F)	10	4	1470	5,0
Trp (W)	2	1	372	1,3
Met (M)	3	1	393	1,4
Ser (S)	20	7	1740	6,0
Thr (T)	11	4	1111	3,8
Tyr (Y)	9	3	1467	5,0
Asn (N)	10	4	1140	3,9
Gln (Q)	18	7	2304	7,9
Cys (C)	4	1	412	1,4
Gly (G)	28	10	1596	5,5
Lys (K)	4	1	512	1,8
Arg (R)	25	9	3900	13,4
Asp (D)	10	4	1150	3,9
Glu (E)	10	4	1290	4,4
His (H)	8	3	1096	3,8
Summe	268		29181	
hydrophob	41			
hydrophil	59			
davon geladen	36			

Tab. 15 Abgeleitete Aminosäurezusammensetzung und Molekulargewicht
der extrazelluläre Lipase von *P. aeruginosa* PAO1

spezielle Sequenzen

In der abgeleiteten Aminosäuresequenz waren drei besondere Bereiche hervorzuheben: eine N-terminale, überwiegend hydrophobe "Signal"-Sequenz, eine Sequenz für das vermutliche aktive Zentrum und eine mögliche Lipoproteinkonsensussequenz.

Der Anfang der Aminosäuresequenz wies einige typische Charakteristika auf, so wie sie für die "Leader"-Sequenz exportierter Proteine gefordert werden: unter den ersten fünf Aminosäuren befand sich ein positiv geladenes Arginin, das in einer "core" Region aus insgesamt acht hydrophoben Aminosäuren eingebettet war (vergl. WATSON, 1984). Wie lang die gesamte, nach Transport über die innere Membran abzuspaltende aminoternale Sequenz ist, ließ sich auf Grund der vorliegenden Daten nicht ermitteln.

Die Nukleotide von Pos. 1513 bis 1530 der DNA-Sequenz kodierten für eine Aminosäureabfolge (Ile-Gly-His-Ser-His-Gly), die bereits für andere Lipasen als aktives Zentrum definiert wurde (vergl. 1.; KUGIMIYA et al., 1986). Die Wahrscheinlichkeit, daß eine solche Sequenz bei gegebener Aminosäurezusammensetzung rein zufällig auftritt, kann vernachlässigt werden, da sie lediglich $6,3 \times 10^{-7}$ beträgt.

Eine dritte Auffälligkeit zeigte ein Abschnitt, der nahe dem Carboxy-Terminus zu finden war (Nukleotid-Pos. 1966 bis 1986; Abb. 11) und für die Aminosäureabfolge: Leu-Val-Gly-Thr-Cys-Ser-Ser kodierte, die große Ähnlichkeit mit einer Sequenz von Lipoproteinen (Leu-Leu-Val/Ala/Ser-Gly/Ala-Cys-Ser-Ser; PUGSLEY, 1988) aufwies, die dort zum Anheften von Fettmolekülen dient. Mögliche Funktionen dieser Proteindomäne werden in Abschnitt 4. "Molekularge-netik" diskutiert.

4. DISKUSSION

Vorarbeiten

Grundlage für alle in dieser Arbeit durchgeführten genetischen Untersuchungen war der Stamm PA01 von *P. aeruginosa* (HOLLOWAY, 1955), der eine extrazelluläre Lipase (3.3.1.) bildete, deren zugehöriges Gen untersucht werden sollte. Darüberhinaus eignete er sich für kreuzungsgenetische Experimente, da Methoden zur Chromosomenmobilisierung, entsprechend gut charakterisierte Mutanten und eine durch ca. 200 Genloci definierte Genkarte (Zusammenfassung: HOLLOWAY, 1986) für diesen Stamm existierten. Die Auswahl eines geeigneten Stammes in Hinblick auf molekulargenetische Untersuchungen war weniger kritisch.

Eine zweite Voraussetzung für viele der folgenden Experimente war ein einfaches Nachweisverfahren, um mit einem Plattentest eindeutig zwischen Lipaseproduzenten und Nichtproduzenten unterscheiden zu können. Wie unter 3.1. dargelegt, wurde von dem Indikatormedium gefordert, daß eine Lipasereaktion spezifisch erkennbar sein muß. Dazu wurde das ausschließlich durch Lipasen spaltbare Triolein (JENSEN, 1983) eingesetzt. In den an der Agaroberfläche befindlichen Olivenöltröpfchen konnte die enzymatisch abgespaltene Ölsäure als weißes Ca-Oleat-Präzipitat nachgewiesen werden (Abb. 1). Der Vorteil dieser CT-Agar-Methode liegt einerseits in der Spezifität der Reaktion, die mit Tween 80, Tributyrin oder Acetat-Verbindungen (3.1.) als spaltbaren Substraten nicht erreicht werden kann, da auch Esterasen hier Aktivität zeigen (OHKAWA et al., 1979). Andererseits können sehr viele Kolonien pro Platte untersucht werden, weil die Erkennungsreaktion "in" den Kolonien (welche die Öltröpfchen umschließen) stattfindet und nicht noch zusätzlicher Platz für eventuell entstehende Reaktionshöfe um die Kolonien notwendig ist. Grenzen findet die Methode bei der Ermittlung intrazellulärer Enzymaktivitäten sowie bei der Quantifizierung; keine Beschränkung besteht hinsichtlich der zu testenden Organismen und des verwendeten Nähragars (NB-, LB-, Minimalmedium (2.2.)).

Klassische Genetik

Die klassisch-genetischen Untersuchungen zur Lipase und Lipaseproduktion von *P. aeruginosa* bildeten einen abgeschlossenen Hauptabschnitt dieser Arbeit. Hierunter wurden die Gewinnung von Lip⁻-Mutanten, ihre Charakterisierung und die Kartierung des zugehörigen Genlocus für das Lipase-Strukturgen (*lip*) auf der Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1 zusammengefaßt.

Erster Schritt in dieser Versuchsreihe war die Selektion geeigneter Mutanten. Dazu wurden verschiedene Mutagenisierungsansätze ausprobiert, um möglicherweise für aufbauende Experimente bereits optimale Voraussetzungen schaffen zu können.

Aus einer Transposonmutagenese hervorgegangene Mutanten hätten den Vorteil, daß mit ihrer Hilfe entsprechende Gene leichter kloniert werden können. Die eingeschränkte Auswahl der zur Anwendung in *P. aeruginosa* geeigneten Transposone und Transposondonorsysteme zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit, als sie eingesetzt werden sollten (vergl. 1.), ließ diesen Versuchsansatz scheitern. Die hier zu mutagenisierenden *P. aeruginosa*-Stämme waren bereits so hoch gegen Kanamycin resistent, daß der Transfer des Transposons Tn5 nicht nachgewiesen werden konnte (3.2.) und somit die Basis für eine Selektion von Mutanten entfiel.

Da aus jedem Mutagenisierungsansatz eine Vielzahl von phänotypisch gleichen Lip⁻-Mutanten hervorging, die sich alle durch eine fehlende extrazelluläre Lipaseaktivität auszeichneten, war es wichtig, die gewünschten Mutanten mit Veränderungen im Strukturgen der Lipase eindeutig von Transport- und/oder Regulationsmutanten abgrenzen zu können. Die Auswahl von temperatursensitiven, Lipase-negativen Mutanten sollte eine direkte Differenzierung ermöglichen. Dazu mußte überprüft werden, ob das Lipaseenzym, das von einer Mutante, die bei erhöhter Anzuchttemperatur keine, wohl aber bei niedrigeren Temperaturen eine aktive Lipase ausschleust, ein gegenüber dem Wildtyp-Enzym differenziertes, temperaturabhängiges Inaktivierungsverhalten zeigt. So ist nachzuweisen, daß das Protein selbst hitzelabil ist und nicht sekundäre Phänomene wie Regulation und/oder Export. Ein einfacher Nachweis der Enzymproduktion bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen ist nicht ausreichend, wie u. a. aus revidierten Ergebnissen für Elastase-negative *ts*-Mutanten hervorgeht, deren eigentlicher Defekt in einem Gen für ein

Exporthilfsprotein lag und nicht das Elastase-Strukturgen betraf (SCHAD et al., 1987; GOLDBERG & OHMAN, 1987).

60 verdächtige, möglicherweise temperaturbeeinflussbare Mutanten wurden überprüft; aber nur eine Mutante erschien für eine genauere Untersuchung vielversprechend. Obwohl für die Mutante bei 30°C Bebrütungstemperatur Wildtyp-Lipaseaktivität, bei 37°C dagegen keine Enzymaktivität nachgewiesen wurde, konnte kein Unterschied zwischen Mutanten- und Wildtyp-Enzym bezüglich ihres Verhaltens gegenüber Hitze (getestet bis 90°C) festgestellt werden (3. 2.). Da die Ausbeute an potentiellen Mutanten so gering war, wurde die Suche nach *ts*-Mutanten nicht fortgesetzt.

Weitere Experimente zur differenzierten Mutantensuche erstreckten sich auf verschiedene *Lip*⁻-Mutanten, die nach NG-Behandlung von *P. aeruginosa* PAO2302 gewonnen wurden. Der Mutantenelternstamm zeichnete sich durch Wildtyp-Lipaseaktivität (Tab. 2) aus; außerdem trug er einige bereits lokalisierte Gendefekte, die als Marken in Kreuzungsexperimenten nützlich sein werden.

Ein direkter Nachweis, ob fehlende Lipaseaktivität im extrazellulären Milieu tatsächlich auf Mutation des Lipase-Strukturgens zurückzuführen ist, war für vollständig Enzym-defekte Mutanten zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zu führen. Deshalb wurde versucht, so viele physiologische und biochemische Charakteristika von *Lip*⁻-Mutanten und zugehörigem Elternstamm PAO2302 zu vergleichen, daß die Wahrscheinlichkeit, eine Strukturgenmutante zu selektieren, möglichst groß wurde. Besonderer Wert wurde dabei u. a. auf die Beobachtung pleiotroper Effekte bezüglich des Auftretens verschiedener Exoprodukte gelegt, da dies insbesondere mit allgemeinen Transport-, aber auch Regulationsdefekten in Verbindung gebracht werden muß (WRETLIND et al., 1977; WRETLIND & PAVLOVSKIS, 1984).

Die unabhängig voneinander aus zwei verschiedenen Mutagenisierungsansätzen hervorgegangenen Mutanten 29-1 und 6-1 (3.2.) wurden auf Grund der in dieser Arbeit detailliert dargestellten Untersuchungsergebnisse (3.3.) als Lipase-Strukturgenmutanten (*lip*) definiert. Um Unterschiede deutlich machen zu können, wurden außerdem Resultate, die mit den phänotypisch *Lip*⁻, genotypisch aber nicht genauer untersuchten Mutanten 28-1 und 17-1 erhalten wurden, in einige der Ergebnistabellen mit einbezogen.

Zunächst wurden extrazelluläre Lipase-Enzymaktivitäten bei verschiedenen Anzuchtbedingungen überprüft, um einerseits zu allgemeinen Aussagen über die Mutanten zu kommen und andererseits Hinweise auf mögliche regulatorische Veränderungen zu erhalten. Unabhängig von Anzuchttemperatur (30°C oder 37°C), Mediumzusammensetzung (NB-Voll- oder Minimalmedium) oder der Anzuchtumgebung (Flüssigkultur oder Platten) (3.3.1.) entließen die *lip*⁻-Stämme PAO1 und PAO2302 immer eine vergleichbar hohe Lipaseaktivität ins extrazelluläre Milieu. Für die vier Mutanten (29-1; 6-1; 28-1; 17-1) war auf Platten mit Triolein als Indikator (Lipase-spezifisch) keine Lipaseaktivität nachweisbar (Abb. 1(b)). Im pNPP-Test (nicht Lipase-spezifisch; Tab. 2) wurde jeweils eine geringe enzymatische Spaltungsaktivität gemessen, die in einem Zusatzversuch (Tab. 3) eindeutig als Esteraseaktivität bestimmt wurde. Untersuchungen zur Lokalisierung der Esterase bestätigten die von OHKAWA et al. (1979) publizierten Befunde, daß es sich hierbei - im Gegensatz zur Lipase - um ein membranständiges Enzym handelt. Die Bestimmung der pNPP-Spaltungsaktivität der Mutanten (29-1 und 6-1) ging auf die Esteraseaktivität der nicht vollständig abgetrennten Zellen und Zelltrümmer bzw. auf cytoplasmatische Aktivitäten zurück. Unterstützung fand dieses Ergebnis durch Wuchsversuche: alle *lip*⁻-Stämme konnten sowohl mit Triolein als auch Tween 80 als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, während die *Lip*⁻-Mutanten nur das auch durch Esterasen spaltbare Tween 80 verwerten konnten. Durch diese Versuchsergebnisse wurde gezeigt, daß die betrachteten Faktoren keinen regulativen Einfluß auf die Mutanten nahmen, um diese wieder zur Bildung extrazellulärer Lipase anzuregen. Regulatorische Mutanten, so wie sie beispielsweise von WRETLIND & PAVLOVSKIS (1984) beschrieben wurden, zeigten für extrazelluläre Enzyme ein anderes Aktivitätsbild: auf Agarplatten war keine extrazelluläre (oder zellgebundene) Enzymaktivität meßbar, wohl aber in Flüssigkultur. Eine gewisse Auswirkung der Anzuchttemperatur auf die Menge der nachweisbaren extrazellulären Lipase, die für die *lip*⁻-Stämme galt (Tab. 2), wurde bei den Mutanten nicht reproduziert, da ihre pNPP-Restaktivität von einem anderen Enzym herrührte. Das hier beobachtete Phänomen war vermutlich auf unterschiedliche Wachstumsphasen zurückzuführen, in denen sich die bei 30°C oder 37°C gezüchteten Bakterienzellen befanden, als für sie die extrazelluläre Lipaseaktivität bestimmt wurde.

Ein weiterer Versuchsansatz zur Charakterisierung der Lip-Mutanten als Lipase-Strukturgenmutanten basierte auf der Analyse des gleichzeitigen Auftretens verschiedener Exoprodukte. Wie bereits erwähnt, führen Veränderungen in der Regulation und/oder im Transport oft zu pleiotropen Phänotypen, für die ein konzentrierter Ausfall vermutlich gleichsinnig regulierter bzw. transportierter Exoprodukte beobachtet wird. Nach WRETLIND & PAVLOVSKIS (1984) werden solche Mutanten zwei Klassen zugeordnet. In Klasse I werden die transportdefekten Mutanten zusammengefaßt, die die Exoenzyme zwar bilden, sie aber nicht abgeben, so daß sie in einem Plattentestverfahren nicht (oder nur nach verlängerter Inkubation) nachgewiesen werden können. Die Klasse II-Mutanten repräsentieren die Regulationsmutanten, deren Exoproduktsynthese nur in Flüssigkultur stattfindet. Können nun für eine Lip-Mutante bei Fehlen von Lipaseaktivität alle anderen Exoprodukte unvermindert im Plattentest nachgewiesen werden, handelt es sich wahrscheinlich um eine Strukturgenmutante. Genau dieses wurde für die Mutanten 29-1 und 6-1 beobachtet (Tab. 6). Die aus Vergleichsgründen aufgeführten Lip-Mutanten 28-1 und 17-1 (Tab. 6) hoben sich eindeutig davon ab, da bei ihnen gleichzeitig mehrere Exoprodukte fehlten. Welchen genotypischen Defekt diese Mutanten aufwiesen, wurde nicht überprüft. Die Grenzen einer solchen Untersuchungsmethode ergeben sich, wenn die Synthese einzelner extrazellulärer Genprodukte selektiv positiv reguliert wird, wie dies beispielsweise für das Toxin A bekannt ist, dessen Bildung durch das Genprodukt von *toxR* beeinflusst wird (WOZNIAK et al., 1987). Gleiches gilt, wenn der Transport spezifisch von einem Helferprotein abhängt. Hierfür sei als Beispiel das *lasA*-Genprodukt genannt, das beim Export der Elastase (Genprodukt von *lasB*) und gleichzeitig auch bei der Aktivitätssteigerung eine Rolle spielt (GOLDBERG & OHMAN, 1987). Da für die Lipase von *P. aeruginosa* weder allgemeine noch spezielle Regulations- oder Exportmechanismen bekannt sind, ist hier nicht mit Sicherheit auszuschließen, daß die Lipasenegativität der Mutanten 29-1 und 6-1 auch durch Veränderungen solcher Systeme zu beschreiben wäre.

Ergebnisse nachfolgender Experimente (3.3.4.), zu denen "Ablöseversuche" und Strukturuntersuchungen der äußeren Membran zählten, grenzten mögliche Transportdefekte der betrachteten Mutanten (29-1 und 6-1) weiter aus. Es wurde versucht, ob durch das Polysaccharid

Alginat, analog zu Ergebnissen, die mit der "detachment-Hypothese" erklärt werden (WINGENDER & WINKLER, 1984), Lipaseaktivität im extrazellulären Milieu durch spezifischen Übertritt vermehrter Enzymmengen gesteigert werden kann. Für die *lip*⁺-Stämme traf dies mit einer Erhöhung der extrazellulären Lipaseaktivität um den Faktor 7,6 bei Stamm PAO2302 (Tab. 4) zu. Aus den *Lip*⁻-Stämmen wurde keine, vielleicht in der Membran steckengebliebene, aktive Lipase durch Alginat abgelöst (Tab. 4). Dasselbe Ergebnis wurde mit Triton X-100 erzielt, einem Detergenz, das unspezifisch Proteine aus Membranen herauslösen kann. Die pNPP-Spaltungsaktivität, die nach TX-Behandlung der *lip*-Mutanten 29-1 und 6-1 dennoch im extrazellulären Milieu nachgewiesen wurde (Tab. 5), ging wahrscheinlich auf die nicht mutativ veränderte, normalerweise membranständige Esterase zurück (3. 3.1.). Ob in beiden Versuchen eventuell inaktives Enzymprotein abgelöst wurde, konnte nicht nachgewiesen werden, da keine Lipase-Antikörper verfügbar waren, und ein direkter Nachweis von Lipaseprotein in einer PAGE aus Mengengründen nicht in Betracht kam.

Die Überprüfung des Protein- und LPS-Musters der äußeren Permeabilitätsbarriere auf mögliche Veränderungen ergab eine Übereinstimmung in der Zusammensetzung der äußeren Membran für die Mutanten 29-1 und 6-1 mit ihrem *lip*⁺-Elternstamm PAO2302. Somit waren strukturelle Unterschiede als Grundlage für den Lipasedefekt dieser Mutanten unwahrscheinlich, wie sie beispielsweise von FECYCS & CAMPBELL (1985) für Mutanten des Esterasetransports gefunden wurden. Abweichungen zwischen den beiden Lipaseproduzenten PAO 2302 und PAO1, die für PAO2302 eine Konstitutivität des D₁-Proteins (Abb. 2) bzw. fehlende Rezeption einiger Bakteriophagen (Tab. 7) ergaben, hatten keinen Einfluß auf die extrazelluläre Lipaseaktivität.

Auf Grund der hier diskutierten vielfältigen Charakterisierungsversuche wurden die Mutanten 29-1 und 6-1 als Lipase-Strukturgenmutanten definiert. Ein Defekt im Transport des Enzyms konnte ausgeschlossen werden, die Möglichkeit, daß es sich um Mutanten eines positiven Regulationsgens der Lipase handeln könnte, wurde nicht widerlegt.

Später durchgeführte molekulargenetische Untersuchungen belegten dann eindeutig, daß der Gendefekt der Mutanten 29-1 und 6-1 tatsächlich auf Veränderungen des Strukturgens der Lipase beruhen

mußte. Sequenzanalysen zeigten nämlich, daß Plasmid pSW101, welches den Lipasedefekt beider Mutanten komplementierte, für ein Lipase-Enzym kodierte.

Die Lipase-Strukturgenmutanten (*lip*) 29-1 und 6-1 wurden eingesetzt, um den zugehörigen Genlocus auf der Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1 festzustellen. In einer dreistufigen Versuchsreihe wurde die Position eingekreist und die Absolutwerte in "min", auf Basis der 95 min langen Genkarte von HOLLOWAY & MATSUMOTO (1984), angegeben. Eine orientierende Kartierung (3.4.1.) erfolgte durch Kreuzungsversuche mit dem bei Position 0 min gegen den Uhrzeigersinn mobilisierenden Plasmid FP5 (MATSUMOTO & TAZAKI, 1973). Das Ergebnis zeigte, daß sich die feiner abgestufte Lokalisierung mit R68.45 auf den Bereich > 45 min des Chromosoms konzentrieren mußte, und ergab eine Position für den *lip*-Locus zwischen 55 min und 60 min (3.4.2.). Transduktionsexperimente mit dem Phagen G101, die sich durch eine hohe Auflösungskapazität auszeichneten und somit die genaueste Ortsbestimmung ermöglichten, führten zu der Aussage, daß der *lip*-Genlocus ausschließlich mit der bei 57 min festgelegten *pyrF*-Genmarke (Orotidin-5-phosphat Decarboxylase) zu 60 % cotransduzierbar war (3.4.3.). Der Abstand beider Loci ließ sich auf etwa 20 kb berechnen.

Die während dieser Arbeit erschienene Publikation zur Rekalibrierung der *P. aeruginosa* PAO1-Genkarte, gefunden mit neuen, effizienteren Transfersystemen (O'HOY & KRISHNAPILLAI, 1985; 1987), hatte keinen Einfluß auf die relative Positionierung des *lip*-Locus (Cotransduktion mit *pyrF*), lediglich die absolute Angabe verschob sich von 57 min auf 39 min (vergl. Abb. 5) und der Abstand der cotransduzierten Genmarken vergrößerte sich entsprechend auf 25 kb.

Der für das Lipase-Strukturgen aufgefundene Genort paßte gut in das Bild, welches sich aus der Anordnung der Strukturgenloci anderer Exoprodukte auf der Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1 ergab. Sie waren alle gleichmäßig, ohne erkennbare Häufung in einer bestimmten Region ("cluster"), über das gesamte Chromosom verteilt:

23 min		= Exoenzym S	(NICAS, 1986)
57 min	- <i>lip</i>	= Lipase	(WOHLFARTH & WINKLER, 1988)
35 und 67 min	- <i>pvd</i>	= Pyoverdin	(HOHNADDEL et al., 1986)
85 min	- <i>toxA</i>	= Exotoxin A	(HANNE et al., 1983).

Außerdem unterschied sich der hier bestimmte *lip*-Genlocus eindeutig von solchen Genorten, die Export- oder Regulationsmechanismen zugeordnet wurden (WRETTLIND & PAVLOVSKIS, 1984; BJÖRKLIND et al., 1985; FILLOUX et al., 1987):

Klasse I - Exportmutanten

0 min - *xcp-1*; 55 min - *xcp-5*; 67 min - *xcp-6*

Klasse II - Regulationsmutanten

35 min - *xcp-2*, *xcp-3*; 40 min - *xcp-4*; 55 min - *xch-1*, *xch-2*

Die klare Abgrenzung gegenüber den *xch*- und *xcp*-Mutanten, deren Genloci bei 55 min in relativer Nähe zur *lip*-Marke gefunden wurden, war auf Grund von Cotransduktionsergebnissen vorzunehmen. Die Genloci *xch-1* und *xch-2*, die in Zusammenhang mit der Eisenregulation von Exoprodukten stehen, waren mit *met-9011* (= *met-9020*; 19%/9%) cotransduzierbar und wurden in maximaler Nähe von *pyrD* (24%/38%) bestimmt (BJÖRKLIND et al., 1985). Ähnliches galt für *xcp-5* - *xcp-53*, die mit den Genmarken *met-9011* (42%-74%) und *leu-10* (12%-40%) cotransduzierten (WRETTLIND & PAVLOVSKIS, 1984). Die *lip*-Genmarke war dagegen mit keiner der hier betrachteten Marken cotransduzierbar (Tab. 10). Ein zusätzlicher, physiologischer Beweis zur Abgrenzung der *xcp-5*-Mutanten gegenüber den *lip*-Mutanten war ihr (*xcp*) differenzierter Ausfall verschiedener Exoprodukte, untersuchte man sie in speziellen Agar-Plattenverfahren (vergl. Tab. 6 und WRETTLIND & PAVLOVSKIS, 1984).

Außer der mehrfachen Neubestimmung der relativen Länge der *P. aeruginosa* PAO1-Genkarte mußte auch die Zuordnung verschiedener Gene zu bereits kartierten Gen-Loci revidiert werden. Der Genlocus *lasA* (75 min; HOWE et al., 1983) steht nach neuen Ergebnissen nicht für das Elastase-Strukturgen, sondern für ein spezifisches Transport-Regulations-Gen. Das jetzt mit *lasB* bezeichnete tatsächliche Strukturgen wurde noch nicht kartiert (SCHAD et al., 1987; GOLDBERG & OHMAN, 1987). Genausowenig wurde das positive Regulationsgen *toxR* des Exotoxin A lokalisiert, was allerdings möglicherweise mit dem Locus *tox-2* (35 min) identisch ist (WOZNIAK et al., 1987)

und gleichzeitig auch mit *xcp-2* und *xcp-3* (ebenfalls 35 min) zusammenhängt. Auch *plcA* oder *B* (20 min), ursprünglich mit dem Phospholipase C-Strukturgen in Verbindung gebracht, stellen Genloci von Regulationsgenen dar (GRAY & VASIL, 1981; PRITCHARD & VASIL, 1986).

Molekulare Genetik

Weitergehende Aussagen über das Lipase-Strukturgen sind nur auf DNA-Ebene möglich. Notwendige Voraussetzung für alle molekulargenetischen Arbeiten ist dabei die Klonierung des zu betrachtenden Gens. Dazu waren zwei verschiedene Strategien möglich, die einerseits das heterologe Wirtssystem von *E. coli* oder andererseits ein homologes System mit *P. aeruginosa* als Grundlage hatten. Da die Genetik von *E. coli* hinsichtlich definierter Stämme zur Aufnahme rekombinanter DNA (*recA*, *hsdR*, etc.), einer Vielzahl gut handhabbarer Klonierungsvektoren mit großer Auswahl an Restriktionsschnittstellen sowie ausgereifter Expressionssysteme wesentlich weiter fortgeschritten ist als die der *Pseudomonaden*, wurde anfangs versucht, diese Vorteile zu nutzen. Aus keiner der verschiedenen Genbanken von *P. aeruginosa* PAO1-DNA in *E. coli* (positiver Selektionsvektor oder Cosmid) konnte allerdings ein positiver, Lipase-produzierender Klon (3.5.1.) selektiert werden. Da die Lipase von *P. aeruginosa* bis jetzt nur im qualitativen Maßstab gereinigt werden kann (STÖER et al., 1986), sind eine Aminosäuresequenzierung zur Synthese einer abgeleiteten Oligonukleotidprobe sowie Antikörpergewinnung nicht möglich, d. h., diese beiden Hilfsmittel standen auch nicht zum Auffinden eines positiven Lipase-Klons zur Verfügung. Durch diese Einschränkung, den gewünschten Klon ausschließlich über Aktivitätsbestimmung des Produkts seines vollständig exprimierten Gens erkennen zu müssen, ergaben sich im *E. coli*-Wirtssystem einige Probleme, die sowohl in der speziellen Biochemie und Physiologie des Enzyms als auch in DNA-Spezifika von *Pseudomonas*-Genen begründet sind.

Enzymspezifische Probleme

Lokalisierung des Enzyms nach Klonierung in *E. coli*

Produkte wie Phospholipase C (*plc*), Elastase (*lasB*) oder Exotoxin A (*toxA*), die von *P. aeruginosa* normalerweise ausgeschleust werden, wurden nach Klonierung in *E. coli* membranständig, periplasmatisch oder cytoplasmatisch nachgewiesen: *plc*, assoziiert an die äußere Membran (LORY & TAI, 1983) oder cytoplasmatisch (COLEMAN et al., 1983); *lasB*, zellgebunden (SCHAD et al., 1987); *toxA*, periplasmatisch (DOUGLAS et al., 1987). Gilt dies auch für die Lipase, sind Agar-Plattentests oder auch Mikrotiterplatten-Flüssigkulturanzuchten begrenzt zum direkten Lipase-Enzymnachweis zu verwenden, da bei einer solchen Testanordnung nur nach außen exponierte Aktivitäten erfaßt werden können. Der direkte Aufschluß von Zellen auf Agar-Platten zum Nachweis intrazellulärer Lipaseaktivitäten war in diesem Fall nicht möglich, weil dazu verwendete flüchtige Stoffe, wie beispielsweise Ether oder Chloroform, die Lipase hemmen (STÜER, pers. Mitteilung). Der Aufschluß von Zellen aus (Mikrotiter-)Flüssigkulturanzuchten ergab ebenfalls kein mit Hilfe des unspezifischen pNPP-Nachweisverfahrens differenzierbares Ergebnis, da die intrazellulären Esterasen und Lipasen von *E. coli* das pNPP bereits vollständig umsetzten. Alle anderen, spezifischen Enzymnachweisverfahren (titrimetrischer Trioleintest, biolumineszenter Lipasetest) sind so aufwendig, daß sie zum Durchmustern ("Screening") einer Genbank nicht verwendet werden können.

LPS-Assoziation der *Pseudomonas*-Lipase

Wie STÜER et al. (1986) berichteten, ist die im extrazellulären Milieu gefundene Lipase von *P. aeruginosa* PAC1R mit LPS assoziiert. Diese Aggregation scheint für die Funktion des Enzyms essentiell zu sein, da LPS-freies Enzym in Abwesenheit von LPS-ersetzenden Detergenzien keine Aktivität mehr zeigt (JÄGER, pers. Mitteilung). Ob diese Aktivitätsstabilisierung durch spezifisches LPS - was in einem *E. coli*-Wirt sicherlich nicht vorliegen würde - hervorgerufen wird, ist noch nicht bekannt.

toxisches Genprodukt

Die biologische Funktion der extrazellulären *Pseudomonas*-Lipase ist nicht bekannt. Da sie erst in der spät-exponentiellen Wachstumsphase (STÖER et al., 1986) - zusammen mit anderen als Pathogenitätsfaktoren eingestuften Exoprodukten (NICAS & IGLEWSKI, 1986) - ausgeschleust wird, dient sie vermutlich nicht primär dem Aufschluß von Nährstoffquellen. Untersuchungen über die Spezifität gereinigter Lipase von *P. aeruginosa* PAC 1R (HANNUSCHKA, 1987) ergaben keine Phospholipase-Aktivität, so daß vermutlich auch keine Zellmembran-zerstörende Wirkung - was bei Klonierung in einen heterologen Wirt zu berücksichtigen wäre - vorliegt. Da außerdem bereits verschiedene extrazelluläre Prokaryonten-Lipasen (*P. fragi*, (KUGIMIYA et al., 1986); *P. aeruginosa*, *A. denitrificans* (ODERA et al., 1986) und *S. hyicus* (GÖTZ et al., 1985)) erfolgreich in *E. coli* kloniert und dort exprimiert wurden, ist es unwahrscheinlich, daß das Genprodukt auf den heterologen Wirt toxisch wirkt. Anders kann sich dies natürlich bei Überexpression des Genprodukts verhalten.

DNA-spezifische Probleme

Promotor-Sequenzerkennung

Anfängliche Untersuchungen der Komplementation bestimmter Auxotrophien in *E. coli* durch entsprechende *Pseudomonas*-Gene ergaben eine Expression von nur 0,3-5 % der heterologen Gene (MARTIN et al., 1986; JEENES et al., 1986). Diese Beobachtung wurde durch Sequenzanalyse verschiedener Promotoren von *Pseudomonas*-Genen verständlich. Von den mittlerweile drei verschiedenen *Pseudomonas*-Promotor-Typen (vergl. 1. "Sequenzierung") wird nur eine Kategorie in *E. coli* vollständig erkannt. Die Promotoren der bereits sequenzierten Exoenzyme (*plc*, *lasB*, *toxA*) sind hingegen noch nicht entschlüsselt (vergl. Tab. 12) und unterscheiden sich demnach signifikant von *E. coli*-Konsensussequenzen. Diese Abweichung gilt als Grundlage dafür, daß die *Pseudomonas*-Gene im heterologen Wirt nicht transkribiert und somit nicht exprimiert werden können. Eine Einschränkung der Translation ist darüberhinaus nicht anzunehmen, da die Konsensussequenz der Ribosomenbindestelle (SD-Sequenz) auffällige Ähnlichkeiten für die unterschiedlichen Organismen zeigt.

Terminationsstrukturen

Diese Strukturen können verhindern, wenn sie nicht nur hinter dem betrachteten Gen auftreten, sondern auch davor liegen, sozusagen als Terminatoren eines vorausgehenden Gens, daß die Ablesung des untersuchten Gens von vorgeschalteten *E. coli*-Promotoren aus gesteuert werden kann.

Alle diese aufgezählten Probleme werden umgangen, wenn eine Klonierung im homologen Wirt vorgenommen wird. Dazu eigneten sich die Lipase-Strukturgenmutanten (3.2.), die nach Übertragung rekombinanter Plasmid-DNA in einem einfachen Plattentest (CT-Agar; 3.1.) auf Komplementation ihres Gendefekts untersucht werden konnten. Dieser methodische Ansatz erwies sich als erfolgreich (3.5.2), obwohl auch hier Einschränkungen in der "Klonierfähigkeit" der Lipase auftraten: bereits unter 2200 Klonen sollte sich das gesuchte Gen bei gegebener Genbankgröße mit 99 %iger Sicherheit befinden (CLARK & CARBON, 1976), es wurde aber nur einmal in 6000 Klonen (fast dreifache Anzahl) gefunden. Als Vergleich: das Gen der Orotidin-5-phosphat Decarboxylase wurde in derselben Klonauswahl erwartungsgemäß dreimal unabhängig voneinander selektiert. Gründe für diese Abweichung von der Statistik ergaben sich eventuell aus dem 2-Stufen Klonierungsweg (Abb. 6), bei dem im ersten *E. coli*-Schritt positive Klone auf Grund unbekannter physiologischer Unverträglichkeiten des Genprodukts verloren gegangen sein könnten.

Der einzige hier selektierte *lip'*-Klon enthielt ein rekombinantes Plasmid (pSW1), das aus dem Vektor pKT 248 und einem 3,1 kb großen Sal I-Abschnitt von *P. aeruginosa* PAO1-DNA zusammengesetzt war (3. 6.). In Southern-blotting Experimenten wurde der Ursprung der Insert-DNA bestätigt (3.6.) und gleichzeitig gezeigt, daß es nur eine Kopie des Lipase-Gens pro Chromosom gibt. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden mit dem abgeleiteten Plasmid pSW101 durchgeführt, das ein auf 2,3 kb verkürztes, sogenanntes Sal I-Doppelfragment trug, welches aus den Sal I-Subfragmenten 1+2 (1,3 kb und 0,97 kb; Abb. 9) bestand. Durch Übertragung dieses Plasmids wurde der Lipase-Defekt beider Strukturgenmutanten 6-1 und 29-1 (Tab. 11) bis zum Erreichen von Enzym-Wildtypaktivität wieder ausgeglichen. Mit keinem der beiden Sal I-Subfragmente war eine Komplementation möglich, woraus abzuleiten war, daß das Lipase-Gen eine Erkennungssequenz für die entsprechende Restriktionsendonu-

klease tragen mußte. Darüberhinaus war das Plasmid pSW101 nicht in der Lage, den Defekt von Transport- und/oder Regulationsmutanten (28-1 und 17-1) auszugleichen, so daß Gene dieser Spezifität wahrscheinlich nicht von dem hier betrachteten DNA-Abschnitt kodiert wurden.

Expressionsversuche des Lipase-Gens im heterologen Wirt blieben erfolglos. Obwohl das 2,3 kb Sal I-Doppelfragment in seinen beiden alternativen Orientierungen in die *E. coli*-spezifischen Vektoren pUC19 und pT7-6 umklontiert und somit einem *E. coli*-Promotor nachgeschaltet worden war, konnte nach Übertragung der Plasmidkonstrukte in keinem Zellkompartiment von *E. coli* Lipase-Aktivität gemessen werden, die auf das übertragene Gen zurückzuführen gewesen wäre. Die Vermutung lag nahe, daß das *Pseudomonas*-Gen noch von seinem eigenen Promotor her abgelesen wurde, der in *E. coli* allerdings so schlecht erkannt wird, daß eine Expression von Enzymaktivität nicht meßbar ist. Auf DNA-Ebene könnte dies durch Terminationsstrukturen an beiden Enden des Gens - wie bereits hypothetisch diskutiert (s. o.) - bewirkt werden. Die folgende Sequenzanalyse des 2,3 kb Sal I-Doppelfragments belegte diese Interpretationsmöglichkeit fehlender Lipase-Expression in *E. coli*.

Die Nukleotidsequenz des 2,3 kb großen DNA-Abschnitts enthielt nur einen einzigen offenen Leserahmen (Pos. 1260 bis 2180 in Abb.11), der allen Anforderungen, für das Lipase-Protein zu kodieren, gerecht wurde. Dazu gehörte auf DNA-Ebene die Sal I-Schnittstelle, die das Gen unterbricht, ein Kodongebrauch mit maximaler Verwendung der Basen G und C an 3. Position der Tripletts, eine SD-Sequenz und mögliche Promotorsequenzen stromaufwärts des ATG-Startkodons und ein amber-Stoppkodon mit nachgeschalteter, zu einer Sekundärstruktur auffaltbarer, rho-unabhängiger Terminatorstruktur. Auf Proteinebene ließen sich die Größe des Proteins, eine Aminosäure-Sequenz für das vermutliche aktive Zentrum und ein Signalpeptid als Maßstab anführen.

Bereits im Ergebnisteil wurden in Tab. 12 und 13 *Pseudomonas*-spezifische DNA-Strukturen für SD- und Promotorsequenzen im Vergleich dargestellt. Für das Lipase-Gen aus *P. aeruginosa* wurde eine starke, *E. coli*-ähnliche SD-Sequenz 25 bp entfernt vom möglichen ATG-Startkodon des Gens und 16 bzw. 29 bp weiter eine dem Typ 2 (vergl. 1. "Sequenzierung") entsprechende Promotorsequenz aufgefunden. Allerdings ist ihr Abstand zum Gen unerwartet groß. Eventuell fängt

das Gen nicht mit dem als Startpunkt definierten Triplet ATG für Methionin an, sondern beginnt bereits etwas früher. Andererseits könnte die angenommene SD- und Promotorsequenz nicht den tatsächlichen Strukturen entsprechen. Wenn hierfür allerdings Sequenzabfolgen wie beispielsweise für den Transkriptionsstart des *toxA*- (GRANT & VASIL, 1986) oder *algD*-Gens (DERETIC et al., 1987b) in Frage kommen, für die noch keine Konsensussequenz ermittelt wurde, so könnte auch hier eine Zuordnung erschwert sein. Die Klärung des exakten Starts der Transkription des Lipase-Gens müssen im Folgenden durchgeführte S1 Nuklease-Kartierungs- und Northern-blotting Experimente ergeben.

Die Termination des Gens ist durch ein Stoppkodon und eine im mRNA-Transkript zur Haarnadelstruktur auffaltbare Sequenzfolge definiert. Eine ähnliche Struktur kann auch von einem Sequenzabschnitt ca. 360 bp stromaufwärts vom Lipase-Gen ausgebildet werden. Dies bedeutet, das Gen wird beidseitig von Sekundärstrukturen flankiert, die zur Erklärung für die nicht mögliche Expression des Lipase-Gens in *E. coli* unter Kontrolle spezieller, vorgeschalteter Promotoren herangezogen werden können. Die σ^{70} *E. coli*-Polymerase erkennt zwar den spezifischen Promotor, fällt aber, bevor sie das Lipase-Gen transkribieren kann, wieder von der DNA "ab". Der *Pseudomonas*-Promotor spielt als Transkriptionsstart keine Rolle, da er - wie beschrieben - hier nicht erkannt wird. Für weiterführende Expressionsversuche ist es also notwendig, das gewünschte Gen gezielt auszuschneiden, um es mit seinem ungefähren Startpunkt direkt hinter einen *E. coli*-Promotor zu klonieren. Die Sequenzierung hat auch dazu gute Ansatzpunkte ergeben, wie aus den aufgelisteten Restriktionsschnittstellen für die entsprechende DNA-Region hervorgeht (Anhang 2). Da allerdings bereits für das Toxin A, die Phospholipase C und Gene der Alginatbiosynthese von *P. aeruginosa* positive Regulatorgene (*toxR*, HEDSTROM et al., 1986; *plcR* o. *S*, PRITCHARD & VASIL, 1986, SHEN et al., 1987; *algR*, DARZINS & CHAKRABARTY, 1984) beschrieben wurden, ist nicht auszuschließen, daß ein solches Prinzip ebenfalls für die Lipase gilt. Hinweise hierfür ergeben sich aus einer Nukleotidsequenz 360 bp stromaufwärts vom Lipase-Gen, die ähnlich auch vor den anderen Genen (vergl. Abb. 13) gefunden wurde. Eine eindeutige Funktionszuordnung als regulative Sequenz bleibt aber noch spekulativ (PRITCHARD & VASIL, 1986; GRANT & VASIL, 1986; DERETIC et al.,

1987a). Diese Tatsache würde eine weitere Schwierigkeit bei der effizienten Expression im heterologen Wirt bedeuten. Darüberhinaus wird diskutiert, daß spezielle Promotorsequenzen die Expression von *Pseudomonas*-Genen in der spät-exponentiellen Wachstumsphase auf Transkriptionsebene regulieren. Diese können erst dann abgelesen werden, wenn vorher ein σ^{60} -Faktor zur spezifischen Erkennung der entsprechenden Promotorsequenz synthetisiert worden ist. Ein solches zeitlich differenziertes Einschaltssystem wäre beispielsweise für eine gezielte Synthese toxischer Genprodukte von Vorteil, wenn zellzerstörende Produkte erst zum "Ende" einer batch-Kultur und bei gegeben hoher Zelldichte schnell in großer Quantität gebildet würden, ohne daß externe Induktionssubstanzen zugegeben werden müssen (biotechnologische Anwendung).

Der bekannte G/C-Reichtum von *P. aeruginosa*-DNA (BERGAN, 1981), der auch in diesem Fall mit 66 % bestätigt wurde (3.8.4.), warf bei der Sequenzierung einige Probleme durch Sekundärstrukturbildung auf, die durch den Einsatz spezieller Sequenzierungssubstanzen (7-Deaza-dGTP und dITP; MIZUSAWA et al., 1986) bewältigt wurden. Um das Auftreten dieses Phänomens zu veranschaulichen, wurde gezeigt, daß sich innerhalb der 2,3 kb DNA-Sequenz 211 Abschnitte befanden, die über wenigstens 6 Basenpaare miteinander zu Sekundärstrukturen aufgefaltet werden können. Der mit dem G/C-Reichtum verknüpfte spezielle Gebrauch des Triplettkodes entspricht *Pseudomonas*-Spezifika (vergl. Tab. 13 und 14).

Nach Übersetzung der Nukleotid-Sequenz in eine zugehörige Aminosäure-Sequenz wurde ein Protein erhalten, das mit einem errechneten Molekulargewicht von 29181 sehr gut mit dem in der SDS-Gelelektrophorese bestimmten apparenten Molekulargewicht von 29000 für die Lipase aus *P. aeruginosa* PAC1R (STÜER et al., 1986) übereinstimmte. Die N-terminale Aminosäure-Sequenz ähnelt dabei einem "Leader"-Peptid (hydrophobe Domänen, 3.8.5.), ohne daß auf Grund vorliegender Daten genau zu analysieren ist, wie lang dieses nach Durchtritt durch die innere Membran abzuspaltende Signal wäre. Möglicherweise umfaßt es nur einen sehr kleinen Anteil der terminalen Sequenz (< 20 AS). Dementsprechend muß das extrazelluläre Protein verkürzt sein, da die Präproteinsequenz (= Nukleotid-Sequenz) einem Protein mit höherem Molekulargewicht entspricht, als hinterher extrazellulär gefunden wird. Die dadurch auftretende Massedifferenz ist so gering, daß sie durch Größenbestimmung im

SDS-Gel nicht erfaßt werden kann. Durch die Beobachtung eines Signal-Peptids kann der Transport der extrazellulären Lipase über die innere Membran nach der Hypothese von EMR et al. (1980) erklärt werden. Anhaltspunkte für spezielle Aminosäure-Sequenzen zur Translokation über die äußere Membran wurden nicht gefunden.

Aus der Aminosäurezusammensetzung mit einem Anteil von 41 % hydrophober Aminosäuren - mehr als bei dem integralen Membranprotein PorinF (37 %) (DUCHENE et al., 1988) - muß über Polaritätskoeffizienten eine Hydropathiebewertung vorgenommen werden. Es ist zu erwarten, daß sich nach Auffaltung und Stabilisierung (über die 4 Cystein-Reste) der Aminosäurekette definierte hydrophobe und hydrophile Domänen an der Proteinoberfläche zusammenlagern. Dies läßt sich aus den besonderen Anforderungen an das Enzym auf Grund seiner Reaktionscharakteristik an einer Öl-Wasser-Phasengrenze begründen. Der amphiphile Charakter eines solchen Moleküls wurde bereits von ADRIAN (1987) nachgewiesen. Darüberhinaus wird von JÄGER (pers. Mitteilung) die Hypothese vertreten, daß die Lipase über hydrophobe Domänen mit dem LPS der äußeren Membran assoziiert ist, da sie mit diesem Bestandteil bekanntermaßen nicht nur cogereinigt wird, sondern ihn zum Erhalt der Enzymaktivität sogar benötigt.

Weitere Untersuchungen müssen sich mit dem postulierten aktiven Zentrum des Enzyms, dem Bereich des Moleküls, der zum Anheften an der Phasengrenze dient und mit der vermeintlichen Lipoproteinkonsensussequenz auseinandersetzen. Versuchsergebnisse von LEMMING (pers. Mitteilung) haben bereits gezeigt, daß die Aktivität der *Pseudomonas*-Lipase durch spezifische Serinhemmstoffe zu hemmen ist. Ob dabei das Serin der Aminosäure-Abfolge: Gly-His-Ser-His-Gly (KUGIMIYA et al., 1986) eine Rolle spielt, könnte beispielsweise durch ortsspezifische Mutagenese geklärt werden. Bezüglich der Lipoproteinkonsensussequenz sind bis jetzt nur hypothetische Überlegungen möglich, beispielsweise, ob diese Region durch Anheften eines Lipidmoleküls zur Assoziation der Lipase mit dem LPS beitragen könnte. Aufbau und Funktion eines solchen Proteins würden sich dann allerdings von bekannten Lipoproteinen aus Prokaryonten unterscheiden (PUGSLEY, 1988).

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit können auf DNA-Ebene dazu beitragen, Expressions-/Regulationsphänomene von *Pseudomonas*-Genen darzustellen, um beispielsweise Konsensussequenzen zu beschreiben oder um gezielt Lipase-Hyperproduktionsstämme für biotechnologische Anwendungen zu konstruieren. Andererseits haben sie den Grundstein für ein gezieltes "Proteinengineering" gelegt, um Substrat/Enzym- und Enzym/LPS-Wechselwirkungen sowie Reaktionsmechanismen aufklären zu helfen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen zur Genetik der extrazellulären Lipase von *P. aeruginosa* PAO1 gliederten sich in zwei Abschnitte.

Klassische Genetik

1. Ein Ca-Triolein-Agarplattentest (CT-Agar) wurde entwickelt, um spezifisch zwischen Lipase-Produzenten und -Nichtproduzenten zu unterscheiden.
2. Durch chemische Mutagenese (NG) wurden Lipase-negative Mutanten des Stammes PAO2302 gewonnen. Die phänotypische Charakterisierung ergab für zwei Mutanten einen Defekt im Strukturgen der Lipase. Sie zeichneten sich durch vollständig fehlende Lipaseaktivität (in Flüssigkultur und auf Platten) aus, waren nicht pleiotrop bezüglich anderer Exoprodukte, entließen weder unter Einfluß von Alginat noch Triton X-100 möglicherweise zellgebundene Lipase. Das Protein- und LPS-Profil ihrer äußeren Membran sowie Phagenrezeptionseigenschaften waren unverändert.
3. Aus Konjugations- und Transduktionsexperimenten ergab sich eine Lokalisierung des Lipase-Genlocus in unmittelbarer Nähe (60 % Cotransduktion) der *pyrF*-Marke bei 57 min (bzw. 39 min) auf der Genkarte von *P. aeruginosa* PAO1.

Molekulare Genetik

4. Es wurde eine Genbank (2-Stufen) mit Sal I-Restriktionsfragmenten von *P. aeruginosa* PAO1-DNA und dem Vektor pKT 248 in einer Lipase-negativen Mutante von *P. aeruginosa* erstellt. Im Komplementationstest wurde das rekombinante Plasmid pSW1 gefunden. Es enthielt ein 3,1 kb großes Sal I-Fragment mit dem Lipase-Gen von *P. aeruginosa* PAO1.
5. pSW101 wurde durch Verkürzung des Sal I-Inserts auf 2,3 kb von pSW1 abgeleitet. Restriktionskarte und Expressionsversuche dienten seiner Charakterisierung. Das Lipase-Gen wurde im homologen Wirt (*P. aeruginosa*) nach Übertragung von pSW101 exprimiert. Im heterologen *E. coli*-Wirt konnte dies trotz spezieller Expressionssysteme auf Basis von pUC19 und pT7-6 nicht erreicht werden.

6. Die Sequenzierung des 2,3 kb Sal I-Fragments aus pSW101 ergab einen offenen Leserahmen für die Lipase.
7. SD- und Terminationsstruktur entsprachen allgemein bekannten Sequenzabfolgen, Promotorsequenzen und Kodongebrauch waren *Pseudomonas*-spezifisch.
8. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz stimmte mit Erwartungen für die *Pseudomonas*-Lipase überein: ein Molekulargewicht von 29181; Konsensussequenz eines möglichen aktiven Zentrums; Signalpeptid; hoher Anteil hydrophober Aminosäuren.

6. LITERATUR

- ADAMS, M. H. 1959 Bacteriophages.
Interscience Publishers, New York.
- ADRIAN, F.-J. 1987 Untersuchung einer extrazellulären
Lipase von *P. aeruginosa* durch sog.
Charge-Shift-Elektrophorese.
Hausarbeit an der Abteilung Biolo-
gie der Ruhr-Universität Bochum,
Lehrstuhl für Biologie der Mikro-
organismen.
- BACHMANN, B. 1983 Linkage map of *Escherichia coli*
K-12, edition 7.
Microbiol. Rev. 47, 180-230.
- BAGDASARIAN, M. 1981 Specific-purpose plasmid cloning vec-
tors. II. Broad host range, high copy
number, RSF1010-derived vectors, and
a host-vector system for gene cloning
in *Pseudomonas*.
FREY, J. *Gene* 16, 237-247.
TIMMIS, K. N.
- BERGAN, T. 1981 Human - and animal - pathogenic mem-
bers of the genus *Pseudomonas*.
In: The Procaryotes
Edited by
M. P. Starr; H. Stolp; H. G. Trüper;
A. Balows; H. G. Schlegel.
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg,
New York, Tokio.
- BIGGIN, M. D. 1983 Buffer gradient gels and ^{35}S label as
an aid to rapid DNA sequence determi-
nation.
GIBSON, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80,
HONG, G. F. 3963-3965.
- BIRNBOIM, H. C. 1979 A rapid alkaline extraction procedure
for screening recombinant plasmid
DNA.
DOLY, J. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

- BJÖRKLIND, A. 1985 Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants that hyperproduce exoproteins. *J. Bacteriol.* 162, 1329-1331.
- WRETTLIND, B.
MÖLLEGÅRD, I.
SCHAD, P. A.
IGLEWSKI, B. H.
COX, C. D.
- BODMER, M. W. 1987 Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 909, 237-244.
- ANGAL, S.
YARRANTON, G. T.
HARRIS, T. J. R.
LYONS, A.
KING, D. J.
PIERONI, G.
RIVIERE, C.
VERGER, R.
LOWE, P.
- BORGSTRÖM, B. 1984 Lipases. Elsevier, Amsterdam.
- BROCKMAN, H. L.
- CARUSO, M. 1982 Interactions of Tn7 and temperate phage F116L of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 188, 292-298.
- SHAPIRO, J. A.
- CASADABAN, M. 1980 Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138, 179-207.
- COHEN, S.
- CHEN, S.-T. 1987 Transcription and expression of the exoA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 3081-3091.
- JORDAN, E. M.
WILSON, R. B.
DRAPER, R. K.
CLOWES, R. C.
- CLARKE, L. 1976 A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9, 91-99.
- CARBON, J.
- COHEN, S. N. 1972 Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114.
- CHANG, A. C. Y.
HSU, L.

- COLEMAN, K.
DOUGAN, G.
ARBUTHNOTT, J. P. 1983 Cloning, and expression in *Escherichia coli* K-12, of the chromosomal hemolysin (phospholipase C) determinant of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 153, 909-915.
- DARZINS, A.
CHAKRABARTY, A. M. 1984 Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 159, 9-18.
- DAVIS, B. D.
MINGIOLI, E. S. 1950 Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.* 60, 17-28.
- DEININGER, P. L. 1983 Random subcloning of sonicated DNA: Application to shotgun DNA sequence analysis. *Anal. Biochem.* 129, 216-223.
- DERETIC, V.
GILL, J. F.
CHAKRABARTY, A. M. 1987a Alginate biosynthesis: a model system for gene regulation and function in *Pseudomonas*. *Bio/Technology* 5, 469-477.
- DERETIC, V.
GILL, J. F.
CHAKRABARTY, A. M. 1987b *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: nucleotide sequence and transcriptional regulation of the *algD* gene. *Nucleic Acids Res.* 15, 4567-4581.
- DIXON, R. 1986 The *xylABC* promoter from the *Pseudomonas putida* TOL plasmid is activated by nitrogen regulatory genes in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 203, 129-136.
- DONOVAN, W. P.
KUSHNER, S. R. 1983 Cloning and physical analysis of *pyrF* gene (coding for orotidine-5'-phosphate decarboxylase) from *Escherichia coli* K-12. *Gene* 25, 39-48.

- DOUGLAS, C. M. 1987 Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*: active, cloned toxin secreted into the periplasmatic space of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169, 4962-4966.
- GUIDI-RONTANI, C.
COLLIER, J.
- DUCHENE, M. 1988 Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene. *J. Bacteriol.* 170, 155-162.
- SCHWEIZER, A.
LOTTSPPEICH, F.
KRAUSS, G.
MARGET, M.
SPECHT, B.-U. v.
DOMDEY, H.
- EMR, S. D. 1980 A mechanism of protein localization: signal hypothesis and bacteria. *J. Cell Biol.* 86, 701-711.
- HALL, M. N.
SILHAVY, T. J.
- FECYCS, I. T. 1985 Mechanisms of activation and secretion of a cell-associated precursor of an exocellular protease of *Pseudomonas aeruginosa* 34362A. *J. Biochem.* 146, 35-42.
- CAMPBELL, J. N.
- FILLOUX, A. 1987 Characterization of two *Pseudomonas aeruginosa* mutants with defective secretion of extracellular proteins and comparison with other mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* 40, 159-163.
- MURGIER, G.
WRETLIND, B.
LAZDUNSKI, A.
- Focus, BRL 1987 (anonym)
- FRIEDMAN, A. M. 1982 Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18, 289-296.
- LONG, S. R.
BROWN, S. E.
BUIKEMA, W. J.
AUSUBEL, F. M.
- FÜRSTE, J. P. 1986 Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* 48, 119-131.
- PANSEGRAU, W.
FRANK, R.
BLÖCKER, H.
SCHOLZ, P.
BAGDASARIAN, M.
LANKA, E.

- GERHARDT, P. 1981 Manual of Methods for General Bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- MURRAY, R. G. E.
COSTILOW, R. N.
NESTER, E. W.
WOOD, W. A.
KRIEG, N. R.
PHILLIPS, G. B.
- GOLDBERG, J. B. 1987 Activation of an elastase precursor by the *lasA* gene product of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 169, 4532-4539.
- OHMAN, D. E.
- GÖTZ, F. 1985 Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. *Nucleic Acids Res.* 13, 5895-5906.
- POPP, F.
KORN, E.
SCHLEIFER, K. H.
- GRANT, C. C. R. 1986 Analysis of transcription of the exotoxin A gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 168, 1451-1456.
- VASIL, M. L.
- GRAY, G. L. 1981 Mapping of a gene controlling the production of phospholipase C and alkaline phosphatase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 183, 403-405.
- VASIL, M. L.
- GRAY, G. L. 1984 Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2645-2649.
- SMITH, D. H.
BALDRIDGE, J. S.
HARKINS, H. N.
VASIL, M. L.
CHEN, E. Y.
HEYNEKER, H. L.
- GUEROLA, N. 1971 Induction of closely linked multiple mutations by nitrosoguanidine. *Nature* 230, 122-125.
- INGRAHAM, J. L.
CERDA-OLMEDO, E.
- GUNSALUS, I. C. 1986 The Bacteria. Volume X: The Biology of *Pseudomonas*. Academic Press, Inc., Orlando.
- SOKATCH, J. R.
ORNSTON, L. N.

- HAAS, D.
HOLLOWAY, B. W. 1976 R factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa*.
Mol. Gen. Genet. 144, 243-251.
- HAAS, D.
HOLLOWAY, B. W.
SCHAMBOCK, A.
LEISINGER, T. 1977 The genetic organization of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.
Mol. Gen. Genet. 154, 7-22.
- HAAS, D.
CRYZ, S. J.
ITOH, Y.
LEISINGER, T.
LUTHI, E.
MERCENIER, A.
REIMANN, C.
RELLA, M.
SOLDATI, L.
WATSON, J. M.
WRETLIND, B. 1984 Some applications of transposon insertion mutagenesis.
In: *Genetique des microorganismes industriels*, pp. 91-111, (H. Heslot, ed.), Soc. Fr. Microbiol., Paris
- HADERO, A.
CRAWFORD, I. P. 1986 Nucleotide sequence of the genes for tryptophan synthase in *Pseudomonas aeruginosa*.
Mol. Biol. Evol. 3, 191-204.
- HAMES, B. D.
RICKWOOD, D. 1983 *Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach*.
IRL Press, Oxford.
- HANCOCK, R. E. W.
CAREY, A. M. 1979 Outer membranes of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins.
J. Bacteriol. 140, 902-910.
- HANCOCK, R. E. W.
CAREY, A. M. 1980 Protein D1 - a glucose-inducible, pore-forming protein from the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*.
FEMS Microbiol. Lett. 8, 105-109.
- HANNE, L. F.
HOWE, T. R.
IGLEWSKI, B. H. 1983 Locus of the *Pseudomonas aeruginosa* toxin A gene.
J. Bacteriol. 154, 383-386.

- HANNUSCHKA, S. 1987 Untersuchungen zur Substratspezifität extrazellulärer Lipase von *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit an der Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen.
- HELSBERG, M. 1986 Analyse der Nukleotidsequenz von Replikations- und Verteilungsfunktionen des F-Faktors von *Escherichia coli*. Dissertation an der Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen.
- HEDSTROM, R. C.
FUNK, C. R.
KAPER, J. B.
PAVLOVSKIS, O. R.
GALLOWAY, D. R. 1986 Cloning of a gene involved in regulation of exotoxin A expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 51, 37-42.
- HOHN, B. 1979 *In vitro* packaging of λ and cosmid DNA. In: *Methods in Enzymology* 68, 299-309.
- HOHNADEL, D.
HAAS, D.
MEYER, J.-M. 1986 Mapping of mutations affecting pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 36, 195-199.
- HOLLOWAY, B. W. 1955 Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 13, 572-581.
- HOLLOWAY, B. W.
VAN DE PUTTE, P. 1968 Lysogeny and bacterial recombination. In: *Replication and Recombination of Genetic Material*, pp. 175-183. Edited by W. J. Peacock & R. D. Brock. Austral. Acad. Sci.
- HOLLOWAY, B. W.
KRISHNAPILLAI, V.
MORGAN, A. F. 1979 Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43, 73-102.

- HOLLOWAY, B. W.
CROCKETT, R. J. 1982 *Pseudomonas aeruginosa*.
In: Genetic Maps 1982, vol. 2,
pp. 165-167. Edited by S. J. O'Brien.
Cold Spring Harbor, New York:
Cold Spring Harbor Laboratory.
- HOLLOWAY, B. W.
MATSUMOTO, H. 1984 *Pseudomonas aeruginosa*.
In: Genetic Maps 1984, vol. 3,
pp. 194-197. Edited by S. J. O'Brien.
Cold Spring Harbor, New York:
Cold Spring Harbor Laboratory.
- HOLLOWAY, B. W. 1986 Chromosome mobilization and genomic
organization in *Pseudomonas*.
In: The Bacteria, pp. 217-249,
Volume X: The Biology of *Pseudomonas*.
Edited by
I. C. Gunsalus; J. R. Sokatch; L. N.
Ornston.
Academic Press, Inc., Orlando.
- HOWE, T. G. B.
WARD, J. M. 1976 The utilization of Tween 80 as carbon
source by *Pseudomonas*.
J. Gen. Microbiol. 92, 234-235.
- HOWE, T. R.
WRETLIND, B.
IGLEWSKI, B. H. 1983 Comparison of two methods of genetic
exchange in determination of the ge-
netic locus of the structural gene
for *Pseudomonas aeruginosa* elastase.
J. Bacteriol. 156, 58-61.
- INOUE, S.
NAKAZAWA, A.
NAKAZAWA, T. 1984 Nucleotide sequence of the promoter
region of the *xylDEGF* operon on TOL
plasmid of *Pseudomonas putida*.
Gene 29, 323-330.
- ISAAC, J. H.
HOLLOWAY, B. W. 1968 Control of pyrimidine biosynthesis in
Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol. 96, 1732-1741.
- ISAAC, J. H.
HOLLOWAY, B. W. 1972 Control of arginine biosynthesis in
Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol. 73, 427-438.

- JEENES, D. J. 1986 Expression of biosynthetic genes from
SOLDATI, L. *Pseudomonas aeruginosa* and *Escheri-*
BAUR, H. *chia coli* in the heterologous host.
WATSON, J. M. *Mol. Gen. Genet.* 203, 421-429.
MERCENIER, A.
REIMMANN, C.
LEISINGER, T.
HAAS, D.
- JENSEN, R. G. 1983 Detection and determination of lipase
(acylglycerol hydrolase) activity
from various sources.
Lipids 18, 650-657.
- JOHNSON, K. 1986 Nucleotide sequence and transcrip-
PARKER, M. L. tional initiation site of two
LORY, S. *Pseudomonas aeruginosa* pilin genes.
J. Biol. Chem. 261, 15703-15708.
- KLECKNER, N. 1977 Genetic engineering *in vivo* using
ROTH, J. translocatable drug resistance ele-
BOTSTEIN, D. ments.
J. Mol. Biol. 116, 129-159.
- KOUKER, G. 1987 Specific and sensitive plate assay
JÄGER, K.-E. for bacterial lipases.
Appl. Envir. Microbiol. 53, 211-213.
- KRISHNAPILLAI, V. 1971 A novel transducing phage.
Its role in recognition of a possible
new host-controlled modification sys-
tem in *Pseudomonas aeruginosa*.
Mol. Gen. Genet. 114, 134-143.
- KRISHNAPILLAI, V. 1981 Insertions of the transposon Tn1 into
ROYLE, P. the *Pseudomonas aeruginosa* chromo-
LEHRER, J. some.
Genetics 97, 495-511.
- KROPINSKI, A. M. 1979 The extraction and analysis of lipo-
CHAN, L. C. polysaccharide from *Pseudomonas aeru-*
MILAZZO, F. H. *ginosa* strain PAO, and three rough
mutants.
Can. J. Microbiol. 25, 390-398.

- KUGIMIYA, W.
OTANI, Y.
HASHIMOTO, Y.
TAKAGI, Y. 1986 Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 141, 185-190.
- LAMBERT, P. A.
BOOTH, B. R. 1982 Exposure of outer membrane proteins on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 revealed by labelling with (125 I)lactoperoxidase.
FEMS Microbiol. Lett. 14, 43-45.
- LAMM, N. 1985 Die Nukleotidsequenz der Region des Hydroxymethylase- und Immunitäts-Genes des Bakteriophagen T4. Diplomarbeit an der Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen.
- LAWRENCE, R. C.
FRYER, T. F.
REITER, B. 1967 Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases.
Nature 213, 1264-1265.
- LAZAR, G. 1985 Estersynthesen mit Lipasen.
Fette Seifen Anstrichmittel 87, 394-400.
- LORY, S.
TAI, P. C. 1983 Characterization of the phospholipase C gene of *Pseudomonas aeruginosa* cloned in *Escherichia coli*.
Gene 32, 95-101.
- LORY, S.
TAI, P. C.
DAVIS, B. D. 1983 Mechanism of protein excretion by gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A.
J. Bacteriol. 156, 695-702.
- MANIATIS, T.
FRITSCH, E. F.
SAMBROOK, J. 1982 Molecular Cloning: a Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

- MARTIN, C. 1986 Heterologous expression and regulation of the *lysA* genes of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 203, 430-434.
- CAMI, B.
BORNE, F.
JEENES, D. J.
HAAS, D.
PATTE, J.-C.
- MATSUMOTO, H. 1973 FP5 factor, an undescribed sex factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Japan. J. Microbiol.* 17, 409-417.
- TAZAKI, T.
- MATSUMOTO, H. 1981 Chromosomal locations of *catA*, *pobA*, *pcaA*, *dcu* and *chu* genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet. Res.* 38, 251-266.
- NAKAZAWA, T.
OHTA, S.
TERAWAKI, Y.
- MATSUMOTO, H. 1978 Chromosomal location of genes participating in the degradation of purines in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 167, 165-176.
- OHTA, S.
KOBAYASHI, R.
TERAWAKI, Y.
- MCKELLAR, R. C. 1987 Influence of iron(III) and pyoverdine on extracellular proteinase and lipase production by *Pseudomonas fluorescens* B52. *Arch. Microbiol.* 147, 225-230.
- SHAMSUZZAMAN, K.
SAN JOSE, C.
CHOLETTE, H.
- MERMOD, N. 1986 Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 167, 447-454.
- RAMOS, J. L.
LEHRBACH, P. R.
TIMMIS, K. N.
- MILLER, R. V. 1974 F116, D3 and G101: Temperate bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology* 59, 566-569.
- PEMBERTON, J. M.
RICHARDS, K. E.
- MINTON, N. P. 1984 The complete nucleotide sequence of the *Pseudomonas* gene coding for carboxypeptidase G₂. *Gene* 31, 31-38.
- ATKINSON, T.
BRUTON, C. J.
SHERWOOD, R. F.
- MIZUNO, T. 1978 Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* 84, 179-191.
- KAGEYAMA, M.

- MIZUSAWA, S.
NISHIMURA, S.
SEELA, F. 1986 Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deaza-guanosine triphosphate in place of dGTP.
Nucleic Acids Res. 14, 1319-1324.
- MORGAN, A. F.
DEAN, H. F. 1985 Chromosomal map of *Pseudomonas putida* PPN, and a comparison of gene order with the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosomal map.
J. Gen. Microbiol. 131, 885-896.
- NICAS, T. I.
HANCOCK, R. E. W. 1980 Outer membrane protein H1 of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in adaptive and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate, polymyxin B, and gentamycin.
J. Bacteriol. 143, 872-878.
- NICAS, T. I. 1986 Genetic mapping of a gene regulating the production of exoenzyme S in *Pseudomonas aeruginosa* PAO.
In: Abstracts of EMBO-workshop: Genetic Manipulation of *Pseudomonads*-Applications in Biotechnology and Medicine (Geneva, 31 August - 4 September, 1986).
- NICAS, T. I.
IGLEWSKI, B. H. 1986 Toxins and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*.
In: The Bacteria, pp. 195-213, Volume X: The Biology of *Pseudomonas*. Edited by I. C. Gunsalus; J. R. Sokatch; L. N. Ornston.
Academic Press, Inc., Orlando.
- NILSSON, B.
UHLÉN, M.
JOSEPHSON, S.
GATENBECK, S.
PHILIPSON, L. 1983 An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis.
Nucleic Acids Res. 11, 8019-8030.
- NISHIO, T.
CHIKANO, T.
KAMIMURA, M. 1987 Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B.
Agric. Biol. Chem. 51, 181-186.

- NORRANDER, J.
KEMPE, T.
MESSING, J. 1983 Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis.
Gene 26, 101-106.
- ODERA, M.
TAKEUCHI, K.
TOH-E, A. 1986 Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*.
J. Ferment. Technol. 64, 363-371.
- OHKAWA, I.
SHIGA, S.
KAGEYAMA, M. 1979 An esterase on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* for the hydrolysis of long chain acyl esters.
J. Biochem. 86, 643-656.
- O'HOY, K.
KRISHNAPILLAI, V. 1985 Transposon mutagenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome and the isolation of high frequency of recombination donors.
FEMS Microbiol. Lett. 29, 299-303.
- O'HOY, K.
KRISHNAPILLAI, V. 1987 Recalibration of the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO chromosome map in time units using high-frequency-of-recombination donors.
Genetics 115, 611-618.
- OLSEN, R. H.
DEBUSSCHER, G.
MCCOMBIE, W. R. 1982 Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome.
J. Bacteriol. 150, 60-69.
- ORNSTON, L. N.
STANIER, R. Y. 1966 The conversion of catechol and proto-catechuate to β -ketoadipate by *Pseudomonas putida*.
J. Biol. Chem. 241, 3776-3786.
- PASLOSKE, B. L.
FINLAY, B. B.
PARANCHYCH, W. 1985 Cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin gene.
FEBS Lett. 183, 408-413.
- PEMBERTON, J. M. 1974 Size of the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO.
J. Bacteriol. 119, 748-752.

- POUSTKA, A. 1984 Selective isolation of cosmid clones by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4129-4133.
- RACKWITZ, H.-R.
FRISCHAUF, A.-M.
HOHN, B.
LEHRACH, H.
- POOLE, K. 1986 Isolation of the Tn501 insertion mutant lacking porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 202, 403-409.
- HANCOCK, R. E. W.
- PRITCHARD, A. E. 1986 Nucleotide sequence and expression of a phosphate-regulated gene encoding a secreted hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 167, 291-298.
- VASIL, M. L.
- PUGSLEY, A. P. 1988 Greasy proteins. *Microbiol. Sci.* 5, 153-155.
- ROLLOF, J. 1987a Purification and characterization of a lipase from *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta* 921, 364-369.
- HEDSTROM, S. A.
NILSSON-EHLE, P.
- ROLLOF, J. 1987b Positional specificity and substrate preference of purified *Staphylococcus aureus* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 921, 370-377.
- HEDSTROM, S. A.
NILSSON-EHLE, P.
- ROYLE, P. L. 1981 Genetic circularity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J. Bacteriol.* 145, 145-155.
- MATSUMOTO, H.
HOLLOWAY, B. W.
- RUSSEL, M. 1984 Replacement of the *fip* gene of *Escherichia coli* by an inactive gene cloned on a plasmid. *J. Bacteriol.* 159, 1034-1039.
- MODEL, P.
- SANGER, F. 1977 DNA sequence with chainterminating inhibitors. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- NICKLEN, S.
COULSON, A. R.

- SCHAD, P. A. 1987 Cloning and characterization of elastase genes from *Pseudomonas aeruginosa*.
 BEVER, R. A. *J. Bacteriol.* 169, 2691-2696.
 NICAS, T. I.
 LEDUC, F.
 HANNE, L. F.
 IGLEWSKI, B. H.
- SCHAD, P. A. 1988 Nucleotide sequence and expression
 IGLEWSKI, B. H. in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa lasA* gene.
J. Bacteriol. 170, 2784-2789.
- SCHULTE, G. 1982 Glycogen and various other polysaccharides stimulate the formation of
 BOHNE, L. exolipase by *Pseudomonas aeruginosa*.
 WINKLER, U. K. *Can. J. Microbiol.* 28, 636-642.
- SHEN, B.-F. 1987 Nucleotide sequences and expression
 TAI, P. C. in *Escherichia coli* of the in-phase
 PRITCHARD, A. E. overlapping *Pseudomonas aeruginosa*
 VASIL, M. L. *plcR* genes.
J. Bacteriol. 169, 4602-4607.
- SHINE, J. 1974 The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16s ribosomal RNA: Complementary to nonsense triplets and ribosomal binding sites.
 DALGARNO, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346.
- SIERRA, G. 1957 A simple method for the detection of
 lipolytic activity of micro-organisms
 and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substances.
Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 23, 15-22.
- SIMON, R. 1983 A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria.
 PRIEFER, U. *Bio/Technology* 1, 784-791.
 PÜHLER, A.
- SOLDATI, L. 1987 Effective gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* under the control of the *Escherichia coli* consensus promoter.
 JEENES, D. J. *FEMS Microbiol. Lett.* 42, 163-167.
 HAAS, D.

- STADEN, R. 1980 A new computer method for the storage and manipulation of DNA gel reading data.
Nucleic Acids Res. 8, 3673-3694.
- STANISICH, V. A. 1972 A mutant sex factor of *Pseudomonas aeruginosa*.
HOLLOWAY, B. W. *Genet. Res.* 19, 91-108.
- STORMO, G. D. 1982 Characterization of translational initiation sites in *E. coli*.
SCHNEIDER, T. D. *Nucleic Acids Res.* 10, 2971-2996.
GOLD, L. M.
- STÜER, W. 1985 Reinigung und partielle Charakterisierung extrazellulärer Lipase von *Pseudomonas aeruginosa*.
Diplomarbeit an der Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen.
- STÜER, W. 1986 Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*.
JÄGER, K.-E. *J. Bacteriol.* 168, 1070-1074.
WINKLER, U. K.
- SUGIURA, M. 1977 Physicochemical properties of a lipase from *Pseudomonas fluorescens*.
OIKAWA, T. *Biochim. Biophys. Acta* 489, 262-268.
- SUZUKI, T. 1988 Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*.
MUSHIGA, Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 417-422.
YAMANE, T.
SHIMIZU, S.
- TABOR, S. 1985 A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.
RICHARDSON, C. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.
- TABOR, S. 1987 DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase.
RICHARDSON, C. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.

- TSAI, C.-M. 1982 A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 119, 115-119.
- TSUDA, M. 1984 Tn501 insertion mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO.
 HARAYAMA, S. *Mol. Gen. Genet.* 196, 494-500.
 IINO, T.
- ULITZUR, S. 1979 A sensitive bioassay for lipase using bacterial bioluminescence.
Biochim. Biophys. Acta 572, 211-217.
- VASIL, M. D. 1982 Cloning of a phosphate-regulated hemolysin gene (phospholipase C) from *Pseudomonas aeruginosa*.
 BERKA, R. M. *J. Bacteriol.* 152, 431-440.
 GRAY, G. L.
 NAKAI, H.
- WATSON, J. M. 1978 Linkage map of *Pseudomonas aeruginosa* PAT.
 HOLLOWAY, B. W. *J. Bacteriol.* 136, 507-521.
- WATSON, M. E. E. 1984 Compilation of published signal sequences.
Nucleic Acids Res. 12, 5145-5163.
- WERNEKE, J. M. 1985 Development of broad-host-range vectors for expression of cloned genes in *Pseudomonas*.
 SLIGAR, S. G. *Gene* 38, 73-84.
 SCHULER, M. A.
- WILLETTS, N. S. 1981 The insertion sequence IS21 of R68.45 and the molecular basis for mobilization of the bacterial chromosome.
 CROWTHER, C. *Plasmid* 6, 30-52.
 HOLLOWAY, B. W.
- WINGENDER, J. 1984 A novel biological function of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* and its mucoid mutants: stimulation of exolipase.
 WINKLER, U. K. *FEMS Microbiol. Lett.* 21, 63-69.
- WINKLER, U. 1972 *Praktikum der Genetik. Band 1.*
 RÜGER, W. Bakterien-, Phagen- und Molekulargenetik.
 WACKERNAGEL, W. Springer-Verlag, Berlin.

- WINKLER, U. K.
STUCKMANN, M. 1979 Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*.
J. Bacteriol. 138, 663-670.
- WION, K. L.
KIRCHGESSNER, T. G.
LUSIS, A. J.
SCHOTZ, M. C.
LAWN, R. M. 1987 Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence.
Science 235, 1638-1641.
- WOHLFARTH, S.
WINKLER, U. K. 1988 Chromosomal mapping and cloning of the lipase gene of *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Gen. Microbiol. 134, 433-440.
- WOZNIAK, D. J.
CRAM, D. C.
DANIELS, C. J.
GALLOWAY, D. R. 1987 Nucleotide sequence and characterization of *toxA*: a gene involved in exotoxin A regulation in *Pseudomonas aeruginosa*.
Nucleic Acids Res. 15, 2123-2135.
- WRETTLIND, B.
HEDEN, L.
SJÖBERG, L.
WADSTRÖM, T. 1973 Productions of enzymes and toxins by hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to serotype and phage-typing pattern.
J. Med. Microbiol. 6, 91-100.
- WRETTLIND, B.
SJÖBERG, L.
WADSTRÖM, T. 1977 Protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: pleiotropic changes in activity of other extracellular enzymes.
J. Gen. Microbiol. 103, 329-336.
- WRETTLIND, B.
PAVLOVSKIS, O. R. 1984 Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in the formation of extracellular proteins.
J. Bacteriol. 158, 801-808.
- YANISCH-PERRON, C.
VIEIRA, J.
MESSING, J. 1985 Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene 33, 103-119.

ANHANG 1

Darstellung der vollständigen Nukleotidsequenz beider DNA-Stränge des 2,3 kb Sal I-Doppelragments aus pSW101

10	20	30	40	50	60
GTCGACGCCA	GCGGCAACCT	GCTGATCACC	CGCGACATCC	GCAACCTGTT	CGACTACTTC
CAGCTGCGGT	CGCCGTTGGA	CGACTAGTGG	GCGCTGTAGG	CGTTGGACAA	GCTGATGAAG
70	80	90	100	110	120
CTCAGCGCCG	TCGGCGAAGA	GCCCCTGCAG	CAAAGCCTGG	ACCGCCTGCG	CGCCTACATC
GAGTCGCGGC	AGCCGCTTCT	CGGGGACGTC	GTTTCGGACC	TGGCGGACGC	GCGGATGTAG
130	140	150	160	170	180
GCCGCCGAAC	TCCAGGAGCC	GCGCGCGCGC	CAGGCGTTGG	CGCTGATGCA	GCAATACATC
CGGCGGCTTG	AGGTCCTCGG	CCGCGCGCCG	GTCCGCAACC	GCGACTACGT	CGTTATGTAG
190	200	210	220	230	240
GACTACAAGA	AGGAACCTGT	GCTGCTCGAA	CGCGACCTCG	CGCGCCTGGC	CGACCTCGAC
CTGATGTTCT	TCCTTGACCA	CGACGAGCTT	GCGCTGGACG	GCGCGGACCG	GCTGGAGCTG
250	260	270	280	290	300
GCCCTGCGCC	AGCGGGAAGC	CGCGGTGAAA	GCCCTGCGCG	CGCGGATTCT	TCAGCAACGA
CGGGACGCGG	TCGCCCTTCG	GCGCCACTTT	CGGGACGCGC	GCGCCTAAGA	AGTCGTTGCT
310	320	330	340	350	360
AGCGCACGTG	GCGTTCTTCG	CCGACGAGGA	AACCTACAAC	CAGTTCACCC	TGGAGCGCCT
TCGCGTGCAC	CGCAAGAAGC	GGCTGCTCCT	TTGGATGTTG	GTCAAGTGGG	ACCTCGCGGA
370	380	390	400	410	420
GGCGATCCGC	CAGGACGGCA	AGCTCAGCGC	CGAGGAAAAG	GCCGCCGCCA	TCGACCGCCT
CCGCTAGGCG	GTCCTGCCGT	TCGAGTCGCG	GCTCCTTTTC	CGCGGCGGGT	AGCTGGCGGA
430	440	450	460	470	480
GCGCGCCAGC	CTGCCGGAAG	ACCAGCAGGA	AAGCGTGCTG	CCGCAACTGC	AAAGCGAACT
CGCGCGGTCT	GACGGCCTTC	TGGTCGTCCT	TTTCGACGAC	GGCGTTGACG	TTTCGCTTGA
490	500	510	520	530	540
GCAGCAGCAG	ACCGCCGCCC	TCCAGGCCGC	TGGCGCCGGC	CCGGAAGCCA	TCCGCCAGAT
CGTCGTCGTC	TGGCGGCGGG	AGGTCCGGCG	ACCGCGGCCG	GGCCTTCGGT	AGGCGGTCTA
550	560	570	580	590	600
GCGTCAGCAA	CTGGTGGGCG	CCGAAGCCAC	CAACCGCCTG	GAGCAACTCG	ATCGGCAACG
CGCAGTCGTT	GACCACCCGC	GGCTTCGGTG	GTTGGCGGAC	CTCGTTGAGC	TAGCCGTTGC
610	620	630	640	650	660
CTCGGCCTGG	AAGGGCCGGC	TGGACGACTA	TTTCGCCGAG	AAGAGCCGGA	TCGAAGGCAA
GAGCCGGACC	TTCCCGGCCG	ACCTGCTGAT	AAAGCGGCTC	TTCTCGGCCT	AGCTTCCGTT
670	680	690	700	710	720
TACCGGGCTG	AGCGAAGCCG	ACCGCCGCGC	GCGTCGAACG	CTGGCCGAGG	AGCGCTTCAG
ATGGCCCGAC	TCGCTTCGGC	TGGCGGCGCG	CGCAGCTTGC	GACCGGCTCC	TCGCGAAGTC
730	740	750	760	770	780
CGAACAGAAC	GTTTCGCTGG	CGCGCTGGAA	CAGATGCGCC	AGGCCGAGCA	GCGCTGACCG
GCTTGTCCTG	CAAGCGGACC	GCGCGACCTT	GTCTACGCGG	TCCGGCTCGT	CGCGACTGGC

790	800	810	820	830	840
GCACGGAAAC	GCCGAGAACG	CGGCGAAGGG	CGCTTCGGCG	GATAACGCTA	CCCTCAGGGG
CGTGCCTTTG	CGGCTCTTGC	GCCGCTTCCC	GCGAAGCCGC	CTATTGCGAT	GGGAGTCCCC
850	860	870	880	890	900
TGCAGCCCTG	GCGTGGCCGG	CGAGGCGGAA	ACCTGTGCTG	CGCGCCGCTA	CGGAAAAAGG
ACGTCCGGAC	CGCACCGGCC	GCTCCGCCTT	TGGACACGAC	GCGCGGCGAT	GCCTTTTTCC
910	920	930	940	950	960
GCAGGCCACC	CGAAGGTGTC	CGCCCTTTTT	CGTCGCCAGC	CCGGTTCAGC	GGGACAGCTT
CGTCCGGTGG	GCTTCCACAG	GCGGGAAAAA	GCGACGGTGC	GGCCAAGTCG	CCCTGTCTGAA
970	980	990	1000	1010	1020
GCCGTCCAGC	GAGAACTTGC	CGGCGCCATC	GATCAGCAGC	GCCACGCTGA	TCATCAGCAG
CGGCAGGTTC	CTCTTGAACG	GCCGCGGTAG	CTAGTCGTTC	CGGTGCGACT	AGTAGTCGTCT
1030	1040	1050	1060	1070	1080
GGTCAGGGCA	TTATTCATAG	CCGTTGTTCGG	TGATGAAGAA	GCCATTGCGC	ATGTGCACGC
CCAGTCCCGT	AATAAGTATC	GGCAACAGCC	ACTACTTCTT	CGGTAACGGC	TACACGTGCG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
TGAAGATCGC	CACGATCATG	GTGAAGCCCA	CCACCACCGA	CGCCGGACGC	ACCAGCAGGC
ACTTCTAGCG	GTGCTAGTAC	CACCTTCGGG	GGTGGTGGCT	GCGGCCTGCG	TGGTCGTCCG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
CGATCACCAG	CGCCAGGCCG	CCGAAGAACT	CGCGCTGCCG	GCCAGGGTCG	CCAGCAGGTA
GCTAGTGGTC	GCGGTCCGGC	GGCTTCTTGA	GCGCGACGGC	CGGTCCCAGC	GGTCGTCCAT
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GCCAGGGGTC	AGGCCGATGG	ATTCGAACCA	CTGCGCCAAT	GCCGTTCAGG	CCGCGCCGCC
CGGTCCCCAG	TCCGGCTACC	TAAGCTTGTT	GACGCGGTTA	CGGCAAGTCC	GGCGCGGCGG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GAACAATGCC	GAAGAGCTTT	TGCGAACCCT	GGGACATCAG	GGGAAGACCG	GTGCACGATA
CTTGTTACGG	CTTCTCGAAA	ACGCTTGCCA	CCCTGTAGTC	CCCTTCTGGC	CACGTGCTAT
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CGCAGGATGG	CCAGGCCGGC	ACCGGCGTTG	GTCGACTACT	GGTTCGGCAT	TTCCCAGCGC
GCGTCTTACC	GGTCCGGCCG	TGGCCGCAAC	CAGCTGATGA	CCAAGCCGTA	AAGGGTCGCG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
CTTGCGCGTG	ACGGTGCCCA	GGTCTACGTC	ACCGAATGTC	AGCCAGTTGG	ACACTCGGAA
GAACGCGCAC	TGCCACGGGT	CCAGATGCAG	TGGCTTTACAG	TCGGTCAACC	TGTCAGCCTT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
GTCCGCGGCG	AGCAGTTGCT	GCAACAGGTG	GAGGAAATCG	TCGCCCTCAG	CGGCCAGCCC
CAGGCGCCGC	TCGTCAACGA	CGTTGTCCAC	CTCCTTTAGC	AGCGGGAGTC	GCCGGTCCGG
1510	1520	1530	1540	1550	1560
AAGGTCAACC	TGATCGGCCA	CAGCCACGGC	GGGCCGACCA	TCCGCTACGT	CGCCGCCGTA
TTCCAGTTGG	ACTAGCCGGT	GTCGGTGCCG	CCCGGCTGGT	AGGCGATGCA	GCGGCGGCAT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
CGTCCCGACC	TGATCGTTCC	GCCACCACGT	CGGCGCCCCG	CACAAGGGTT	CGGACACCGC
GCGGGGCTGG	ACTAGCAAGG	CGGTGGTGCA	GCCGCGGGGC	GTGTTCCCAA	GCCTGTGGCG

1630	1640	1650	1660	1670	1680
CGACTTCCTG	CGCCAGATCC	CACCGGGTTC	GGCCGGCGAG	GCAGTCCTCT	CCGGGCTGGT
GCTGAAGGAC	GCGGTCTAGG	GTGGCCCAAG	CCGGCCGCTC	CGTCAGGAGA	GGCCCGACCA
1690	1700	1710	1720	1730	1740
CAACAGCCTC	GGCGCGCTGA	TCAGCTTCCT	TTCCAGCGGC	AGCACCGGTA	CGCAGAATTC
GTTGTCGGAG	CCGCGCGACT	AGTCGAAGGA	AAGGTGCGCG	TCGTGGCCAT	GCGTCTTAAG
1750	1760	1770	1780	1790	1800
ACTGGGCTCG	CTGGAGTCGC	TGAACAGCGA	GGGTGCCGCG	CGCTTCAACG	CCAAGTACCC
TGACCCGAGC	GACCTCAGCG	ACTTGTCGCT	CCCACGGCGC	GCGAAGTTGC	GGTTCATGGG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GCAGGCATCC	CCACCTCGGC	CTGCGGCGAA	GGCGCCTACA	AGGTCAACGG	CGTGAGCTAT
CGTCCGTAGG	GGTGGAGCCG	GACGCCGCTT	CCGCGGATGT	TCCAGTTGCC	GCACTCGATA
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TACTCCTGGA	GCGGTTTCCTC	GCCGCTGACC	AACTTCCTCG	ATCCGAGCGA	CGCCTTCCTC
ATGAGGACCT	GCCCAAGGAG	CGGCGACTGG	TTGAAGGAGC	TAGGCTCGCT	GCGGAAGGAG
1930	1940	1950	1960	1970	1980
GGCGCCTCGT	CGCTGACCTT	CAAGAACGGC	ACCGCCAACG	ACGGCCTGGT	CGGCACCTGC
CCGCGGAGCA	GCGACTGGAA	GTTCTTGCCG	TGGCGGTTGC	TGCCGGACCA	GCCGTGGACG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
AGTTCGCACC	TGGGCATGGT	GATCCGCGAC	AACTACCGGA	TGAACCACCT	GGACGAGGTG
TCAAGCGTGG	ACCCGTACCA	CTAGGCGCTG	TTGATGGCCT	ACTTGGTGGA	CCTGTCCAC
2050	2060	2070	2080	2090	2100
AACCAGGTCT	TCGGCCTCAC	CAGCCTGTTC	GAGACCAGCC	CGGTCAAGCGT	CTACCGCCAG
TTGGTCCAGA	AGCCGGAGTG	GTGGGACAAG	CTCTGGTTCG	GCCAGTCGCA	GATGGCGGTC
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CACGCCAACC	GCCTGAAGAA	CGCCAGCCTG	TAGGACCCCG	GCCGGGGCCT	CGGCCCCGGC
GTGCGGTTGG	CGGACTTCTT	GCGGTCGGAC	ATCCTGGGGC	CGGCCCCGGA	GCCGGGGCCG
2170	2180	2190	2200	2210	2220
CCTTTCCCGG	AAGCCCCCTC	GCGTGAAGAA	AATCCTCCTG	CTGATTCCAC	TGGCGTTCGC
GGAAAGGGCC	TTCGGGGGAG	CGCACTTCTT	TTAGGAGGAC	GACTAAGGTG	ACCGCAAGCG
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CGCCAGCCTG	GCCTGGTTTC	TCTGGCTGGA	ACCTTCCCCC	GCACCCGAGA	CGGCGCCCCC
GCGGTGCGAC	CGGACCAAGC	AGACCGACCT	AGGAAGGGGG	CGTGGGCTCT	GCCGCGGGGG
2290	2300				
GGCCAGGCCC	GAGGCGG				
CCGGTCCGGG	CTCCGCG				

ANHANG 2

Restriktionskarte des 2,3 kb Sal I-Doppelfragments

Erkennungssequenzen, auf deren Vorkommen die Nukleotidsequenz untersucht wurde:

Acc I	: GTAGAC/GTATAC/ GTCGAC/GTCTAC	Mae I	: CTAG
Afl II	: CTTAAG	Mae II	: ACGT
Afl III	: ACATGT	Mae III	: GTAAC
Aha III	: TTTAAA	Mlu I	: ACGCGT
Alu I	: AGCT	Mst I	: TGC GCA
Asu II	: TTCGAA	Nae I	: GCCGGC
Ava III	: ATGCAT	Nco I	: CCATGG
Avr II	: CCTAGG	Nde I	: CATATG
Bam HI	: GGATCC	Nru I	: TCGCGA
Bcl I	: TGATCA	Pst I	: CTGCAG
Bin I	: GGATC	Pvu I	: CGATCG
Cfr I	: CGGCCG	Pvu II	: CAGCTG
Cla I	: ATCGAT	Rsa I	: GTAC
Dde I	: CTAAG	Sac I	: GAGCTC
Eco RI	: GAATTC	Sac II	: CCGCGG
Eco RV	: GATATC	Sal I	: GTCGAC
Fnucl II	: CGCG	Sau 3A	: GATC
Fnucl III	: GCGC	Sau 96I	: GGACC
Fnu 4HI	: GCAGC	Sca I	: AGTACT
Gdi I	: AGGCCT	Scr FI	: CCAGG
Hae II	: AGCGCC/GGCGCT	Sma I	: CCCGGG
Hae III	: GGCC	Sph I	: GCATGC
Hind III	: AAGCTT	Taq I	: TCGA
Hinf I	: GANTC	Xba I	: TCTAGA
Hpa I	: GTTAAC	Xho I	: CTCGAG
Hpa II	: CCGG	Xho II	: AGATCC/AGATCT/ GGATCC/GGATCT
Kpn I	: GGTACC	Xma III	: CGGCCG

Darstellung der Restriktionskarte des 2,3 kb Sal I-Doppelfragments

Posi- tion	Name des R.-Enzyms	Erkenn.- sequenz	Posi- tion	Name des R.-Enzyms	Erkenn.- sequenz
1	Acc I	GTCGAC	759	Scr FI	CCAGG
1	Sal I	GTCGAC	770	Hae II	AGCGCT
2	Taq I	TCGA	833	Dde I	CTCAG
23	Bcl I	TGATCA	847	Scr FI	CCAGG
24	Sau 3A	GATC	856	Nae I	GCCGGC
50	Taq I	TCGA	940	Scr FI	CCAGG
61	Dde I	CTCAG	956	Alu I	AGCT
85	Pst I	CTGCAG	979	Nae I	GCCGGC
96	Scr FI	CCTGG	982	Hae II	GGCGCC
99	Sau 96I	GGACC	988	Cla I	ATCGAT
123	Scr FI	CCAGG	989	Taq I	TCGA
138	Nae I	GCCGGC	991	Sau 3A	GATC
150	Scr FI	CCAGG	1008	Bcl I	TGATCA
179	Taq I	TCGA	1009	Sau 3A	GATC
206	Taq I	TCGA	1085	Sau 3A	GATC
225	Scr FI	CCAGG	1094	Sau 3A	GATC
236	Taq I	TCGA	1142	Sau 3A	GATC
260	Sac II	CCGCGG	1153	Scr FI	CCAGG
285	Hinf I	GATTC	1177	Nae I	GCCGGC
306	Mae II	ACGT	1182	Scr FI	CCAGG
349	Scr FI	CCAGG	1202	Scr FI	CCAGG
358	Scr FI	CCAGG	1220	Hinf I	GATTC
364	Sau 3A	GATC	1222	Asu II	TTCGAA
370	Scr FI	CCAGG	1223	Taq I	TCGA
381	Alu I	AGCT	1275	Alu I	AGCT
383	Dde I	CTCAG	1328	Cfr I	TGGCCA
411	Taq I	TCGA	1331	Scr FI	CCAGG
479	Pst I	CTGCAG	1335	Nae I	GCCGGC
502	Scr FI	CCAGG	1351	Acc I	GTCGAC
512	Hae II	GGCGCC	1351	Sal I	GTCGAC
515	Nae I	GCCGGC	1352	Taq I	TCGA
518	Sau 96I	GGACC	1388	Mae III	GTGAC
520	Scr FI	CCAGG	1398	Scr FI	CCAGG
557	Hae II	GGCGCC	1406	Mae II	ACGT
577	Scr FI	CCAGG	1408	Mae III	GTAC
588	Taq I	TCGA	1443	Sac II	CCGCGG
589	Pvu I	CGATCG	1486	Dde I	CTCAG
590	Sau 3A	GATC	1512	Sau 3A	GATC
606	Scr FI	CCAGG	1531	Sau 96I	GGACC
613	Sau 96I	GGACC	1547	Mae II	ACGT
615	Nae I	GCCGGC	1558	Rsa I	GTAC
648	Bin I	GGATC	1560	Mae II	ACGT
649	Sau 3A	GATC	1572	Sau 3A	GATC
651	Taq I	TCGA	1587	Mae II	ACGT
663	Scr FI	CCAGG	1592	Hae II	GGCGCC
668	Dde I	CTGAG	1636	Sau 3A	GATC
694	Taq I	TCGA	1643	Scr FI	CCAGG
711	Hae II	AGCGCT	1650	Cfr I	GGCGCC
729	Mae II	ACGT	1652	Nae I	GCCGGC
736	Scr FI	CCAGG	1671	Scr FI	CCAGG

Position	Name des R.-Enzyms	Erkenn.-sequenz	Position	Name des R.-Enzyms	Erkenn.-sequenz
1698	Bcl I	TGATCA	2069	Taq I	TCGA
1699	Sau 3A	GATC	2079	Scr FI	CCAGG
1703	Alu I	AGCT	2133	Sau 96I	GGACC
1728	Rsa I	GTAC	2133	Ava II	GGACC
1735	Eco RI	GAATTC	2137	Scr FI	CCAGG
1754	Hinf I	GAGTC	2139	Cfr I	CGGCCG
1795	Rsa I	GTAC	2142	Scr FI	CCAGG
1831	Hae II	GGCGCC	2145	Sau 96I	GGACC
1855	Alu I	AGCT	2152	Sau 96I	GGACC
1865	Scr FI	CCAGG	2155	Scr FI	CCAGG
1898	Taq I	TCGA	2158	Sau 96I	GGACC
1900	Sau 3A	GATC	2166	Scr FI	CCAGG
1921	Hae II	GGCGCC	2203	Hinf I	GATTC
1965	Scr FI	CCAGG	2227	Scr FI	CCAGG
1977	Pst I	CTGCAG	2232	Scr FI	CCAGG
1989	Scr FI	CCAGG	2272	Hae II	GCCGCC
2001	Sau 3A	GATC	2278	Scr FI	CCAGG
2028	Scr FI	CCAGG	2283	Scr FI	CCAGG
2043	Scr FI	CCAGG	2286	Sau 96I	GGACC

Restriktionserkennungsstellen im Lipase-Gen wurden durch
Fettdruck hervorgehoben

Außerdem traten folgende Restriktionserkennungsstellen
gehäuft auf:

Fnu D2	:	CGCG	26 mal
Fnu D3	:	GCGC	45 mal
Fnu 4HI	:	GCGGC	38 mal
Hpa II	:	CCGG	26 mal
Hae III	:	GGCC	32 mal

VERÖFFENTLICHUNGEN

- | | | |
|----------------|------|--|
| RIPPEL, S. | 1984 | Phosphoribulokinase from <i>Rhodospseudomonas acidophila</i> . |
| BOWIEN, B. | | <i>Arch. Microbiol.</i> 139, 207-212. |
| WINKLER, U. | 1988 | Mikrobiologie. |
| WOHLFARTH, S. | | In: Trends der modernen Biologie in der Bundesrepublik Deutschland. (U. Winkler, Hersg.) |
| | | 2. Auflage, Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart. |
| WOHLFARTH, S. | 1988 | Chromosomal mapping and cloning of the lipase gene of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . |
| WINKLER, U. K. | | <i>J. Gen. Microbiol.</i> 134, 433-440. |

LEBENS LAUF

Susanne Wohlfarth, geb. Rippel

geboren:	11.12.57	in Braunschweig
Familienstand:	verheiratet	mit Dr. Herbert Wohlfarth
Schulbesuch:	1964 - 1968	Volksschule Wasserkampstraße, Hannover
	1968 - 1976	mathematisch-neusprachliches Gymnasium, Schillerschule, Hannover
	Mai 1976	Abitur am sprachlichen Zweig
Grundstudium:	WS76/77 - SS78	Diplom - Biologiestudium an der Universität Hannover
	SS78	Vordiplom
Hauptstudium:	WS78/79 - SS82	Schwerpunktstudium mit Hauptfach Mikrobiologie an der Georg - August Universität in Göttingen
	SS81	mündliche Diplomprüfungen: Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie org. Chemie
	SS81 - SS82	experimentelle Diplomarbeit mit dem Thema: Anreicherung und Regulation der Phosphoribulokinase aus <i>Rhodopseu- domonas acidophila</i>
DFG-Projekt:	08.82 - 10.83	am MPI für Ernährungsphysiologie in Dortmund; Thema: Cholinerge Kompo- nenten in mikrobiologischen Systeme- men
Promotion:	seit 11.83	an der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Biologie der Mikro- organismen
	seit 12.84	wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Ruhr-Universität Bochum

